



---

**JOSÉ EDUARDO SCABORA**

“A SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE TAURINA ATENUA A ELEVAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL EM PROLE DE RATAS SUBMETIDAS À INGESTÃO HIPOPROTEICA DURANTE A GESTAÇÃO: REPERCUSSÃO SOBRE A FUNÇÃO RENAL E A CITOMETRIA NEURAL DO TRONCO ENCEFÁLICO”

*“TAURINE SUPPLEMENTATION ATTENUATES THE BLOOD PRESSURE RISE IN OFFSPRING OF RATS SUBMITTED TO HYPOPROTEIC INTAKE DURING PREGNANCY: IMPACT ON RENAL FUNCTION AND NEURAL CYTOMETRY OF BRAIN STEM”*

**Campinas  
2012**



---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Médicas

**JOSÉ EDUARDO SCABORA**

**“A SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE TAURINA ATENUA A ELEVÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL EM PROLE DE RATAS SUBMETIDAS À INGESTÃO HIPOPROTEICA DURANTE A GESTAÇÃO: REPERCUSSÃO SOBRE A FUNÇÃO RENAL E A CITOMETRIA NEURAL DO TRONCO ENCEFÁLICO”**

**Orientador: Prof. Dr. José Antônio Rocha Gontijo**  
**Co-Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Aline Boer**

***“TAURINE SUPPLEMENTATION ATTENUATES THE BLOOD PRESSURE RISE IN OFFSPRING OF RATS SUBMITTED TO HYPOPROTEIC INTAKE DURING PREGNANCY: IMPACT ON RENAL FUNCTION AND NEURAL CYTOMETRY OF BRAIN STEM”***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Doutor em Ciências.

*Doctorate thesis presented to the Medical Pathophysiology Postgraduation Programm of the School of Medical Sciences of the State University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Medical Sciences.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO JOSÉ EDUARDO SCABORA E ORIENTADO PELO PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO ROCHA GONTIJO.

Assinatura do Orientador

-----

Campinas  
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

Sca18s

Scabora, José Eduardo, 1971 -

A suplementação dietética de taurina atenua a elevação da pressão arterial em prole de ratas submetidas à ingestão hipoproteica durante a gestação: repercussão sobre a função renal e a citometria neural do tronco encefálico / José Eduardo Scabora. – Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : José Antônio Rocha Gontijo.

Coorientador : Patrícia Aline Boer

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Desnutrição proteica. 2. Aminoácidos. 3. Núcleo solitário. 4. Sistema renina-angiotensina. 5. Hipertensão. I. Gontijo, José Antônio Rocha. II. Boer, Patrícia Aline. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Taurine supplementation attenuates the blood pressure rise in offspring of rats submitted to hypoproteic intake during pregnancy: impact on renal function and neural cytometry of brain stem.

**Palavras-chave em inglês:**

Protein malnutrition

Amino acids

Solitary nucleus

Renin-angiotensin system

Hypertension

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:**

José Antonio Rocha Gontijo [Orientador]

Wellerson Rodrigo Scarano

Mirian Aparecida Boim

José Francisco Figueiredo

Everardo Magalhães Carneiro

**Data da defesa:** 30-07-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica

---

## Banca Examinadora de Tese de Doutorado

---

José Eduardo Scabora

---

**Orientador: Prof. Dr. José Antonio Rocha Gontijo**  
**Co-Orientadora: Profa. Dra Patricia Aline Boer**

---

<b>Membros:</b>
Professor (a) Doutor (a) Wellerson Rodrigo Scarano
Professor (a) Doutor (a) Mirian Aparecida Boim
Professor (a) Doutor (a) José Francisco Figueiredo
Professor (a) Doutor (a) Everardo Magalhães Carneiro
Professor (a) Doutor (a) José Antonio Rocha Gontijo

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 30/07/2012**

---

## **DEDICATÓRIAS**

## DEDICO EM ESPECIAL

***A minha vó,***

*Josepha Domingues Scabollo*

A esta MULHER, mãe e avó sou grato pela dedicação pelo carinho, pelo tempo dispendido a mim, mesmo depois de já ter cumprido o seu papel de mãe criando seus sete filhos, esteve presente nas horas que eu mais precisava mesmo quando eu pensava que sua presença não era necessária, *“Vó olha como a vida é sabia, a senhora com apenas alguns meses de Mobral foi capaz de me ensinar a sonhar a acreditar a desejar e hoje eu posso me tornar um doutor, que o destino me permita ter tal sabedoria para com meus filhos”*. Com toda sinceridade, amor e carinho muito obrigado.

***A minha esposa e aos meus filhos,***

*Danielle Cristine Denardi Malvestite Scabora ao Eduardo Malvestite Scabora e a Beatriz Malvestite Scabora*

Danielle meu amor e minha companheira de tantos anos, obrigado pela compreensão pelas tantas vezes que precisei me ausentar pelo encorajamento e apoio, por abraçar a responsabilidade de cuidar de nossos filhos enquanto eu estudava. Danielle sou eternamente grato a você.

Eduardo foram varias as vezes que você me pedia para ficar e eu precisando cumprir meus compromissos de adulto tinha que ir ligando o carro e saindo devagar, quando você percebia que eu ia mesmo, você sempre invertia o seu discurso dizendo “*bom trabalho, volta logo*”. Como esta pequena frase me faz feliz. Eduardo obrigado por ter me ensinado a ver que o amor tem várias dimensões.

Beatriz minha pequena, você é linda e maravilhosa, neste momento você é um bebe ainda, às vezes eu uso deste fato para poder ler algo novo, escrever uma linha a mais, saiba que isto me chateia, mas por outro lado, muito em breve poderei dar a você mais do bem mais precioso que temos o tempo. Beatriz, obrigado minha querida por você fazer parte da minha família.

## **AGRADEÇO SINCERAMENTE:**

À Universidade Estadual de Campinas e à Faculdade de Ciências Médicas, especialmente ao Programa de Fisiopatologia Médica e ao Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental.

À equipe de pesquisa do Laboratório Hidro-Salino (LHS): Flávia F. Mesquita, Luiz Fernando Possignolo, Noemi Roza, Amanda Almeida, Vinícius Rodrigues, Rafael Borges, Sonia Rachel, Rafael de Holanda, Benito, Vinícius Canale, Silmara Ciampone, Adrianne Palanch, Carmen Mir, Nelson Lutaif, Daniel Bueno, Ize de Lima, Elisabeth Cambiucci, Dioze Guadagnini, Augusto Henrique Custódio, Vergínia Carvalho, Barbara Vaccari Cardoso, Agnes da Silva Lopes e Carolina Staut Pinhal pela amizade e ajuda nos momentos em que mais precisei, principalmente quando relacionados à discussão de trabalhos científicos e a realização de experimentos.

Aos estagiários que passaram pelo LHS disponibilizando suas horas de estágio e seu precioso tempo nos ajudando.

Aos funcionários do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental: Sr. José, Sr. Antônio, Sr. Luiz, Sr. Marcio, Sr. Marino, Carol, Joyce, Willian, Miguel, Dito, Ana, Roberto, Edilene, Jorge, Erasmo por toda colaboração e amizade construída neste período experimental.

Aos colegas de outros laboratórios pela colaboração quanto aos protocolos, uso de equipamentos e discussão científica.

A minha mãe Neide Scabora.



Aos meus sogros Antônio Malvestite e Ilair Denardi Malvestite, pelo apoio, disposição e pela doação sou muito grato a vocês.

Aos meus cunhados Ricardo Malvestite e Mikelle Camargo e ao meu sobrinho José Henrique Camargo Malvestite, por todos os bate papos que tivemos e principalmente por tantas e tantas vezes me acolheram em sua casa.

Aos meus colegas de trabalho, André Hebling e Valdenilson José Zorél, que nos meus momentos de aperto sempre se apresentaram para me ajudar.

Enfim, à todos que colaboraram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho, dedico meus sinceros agradecimentos.

*“Só quem anda tem histórias para contar”.*

*(José Eduardo Scabora).*

## **AGRADEÇO DE FORMA ESPECIAL**

***Ao Prof. Dr. José Antônio Rocha Gontijo***

Pelo espaço, pela atenção, pelos ensinamentos e principalmente por acreditar em mim. Professor muito obrigado.

***À Profa. Dra. Patrícia Aline Boer***

Por abrir as portas do laboratório para mim, me incentivar e ensinar a desenvolver as técnicas de forma precisa e exata. Muito obrigado pela oportunidade de trabalhar do lado de uma pessoa com tanto talento.

***Ao amigo Marcelo Cardoso De Lima***

Que me ensinou a ser ousado, determinado e corajoso. Embora mais novo que eu, tratou-me como se fosse um irmão mais velho, sempre disposto nunca hesitou em me ajudar. Obrigado por estar ao meu lado meu irmão.

*“São fúteis e cheias de erros as ciências que não nasceram da experimentação, mãe de todo conhecimento”.*

(Leonardo da Vinci)

## RESUMO

O presente estudo investigou as alterações pós-natais dos receptores de angiotensina II (AngII) do tronco encefálico resultantes da restrição proteica materna (LP) e seu impacto na programação da hipertensão na idade adulta. Os resultados demonstraram que a massa corpórea da prole ao nascer de machos LP foi reduzida significativamente quando comparado ao grupo controle (NP) ou com a prole LP suplementada com taurina (LPT). Esta redução foi revertida rapidamente nos primeiros 12 dias de vida. A redução da massa corpórea foi acompanhada por uma expressiva redução no número de neurônios do tronco cerebral de ratos, recém-nascidos LP, comparados aos controles adequados e LPT pareados por idade. A análise imunoistoquímica para receptores da AngII também demonstrou que em LP de 16 semanas de vida ocorre diminuição significativa na expressão dos receptores de angiotensina tipo 1 (AT1R) no núcleo do trato solitário (NTS) sendo mais intensa na parte medial do mesmo, comparativamente a NP e LPT. Contrariamente, a expressão dos receptores tipo 2 (AT2R) em LP com 16 semanas de vida não foi diferente na região medial embora estivesse reduzida nas regiões rostral e caudal do NTS. O presente trabalho mostrou redução precoce na excreção urinária de sódio na prole LP, a qual foi abolida pela suplementação de taurina. A redução na fração de excreção de sódio foi acompanhada por um aumento na reabsorção proximal de sódio que ocorreu a despeito de uma inalterada filtração glomerular estimada pela depuração renal de creatinina. No presente estudo é plausível supor uma associação entre o decréscimo no desenvolvimento fetal do NTS, uma menor expressão central de AT1R associada a menor razão AT1R/AT2R e, um decréscimo na excreção urinária hidrossalina. Estas alterações poderiam estar relacionadas à elevação dos níveis pressóricos em LP (progênie deficiente em taurina) comparativamente a prole NP e LPT da mesma idade.

*Palavras chave:* Hipertensão; desnutrição proteica; aminoácidos; sistema renina-angiotensina; núcleo do trato solitário.

## **Abstract**

The current study pays attention to changes of the postnatal brainstem angiotensin receptors by maternal protein restriction (LP), and its impact on in utero programming of hypertension in adult life. The data shows that LP male pup body weight was significantly reduced when compared to that of control (NP) or LP taurine-supplemented (LPT) pups. That fall in in-born LP body weight was rapidly reverted in 12-wk-old LP offspring. The reduced body weight was associated with striking decreases in the neurons number in inborn brainstem LP offspring, when compared to age-matched LP and LPT. Also, the immunohistochemistry analysis demonstrated a significantly decreased expression of type 1 AngII receptors (AT1R) in the entire medial solitary tract nuclei (NTS) of LP rats at 16-week of age compared to age-matched NP and LPT offspring. Conversely, the immunostained type 2 AngII (AT2R) receptors in 16-wk-old LP medial NTS were unchanged, although, they were expressively decreased in rostral and caudal NTS subnuclei. The present investigation shows an early decrease in fractional urinary sodium excretion in maternal protein-restricted offspring reverted by diet taurine supplementation. The decreased fractional sodium excretion was accompanied by a fall in proximal sodium excretion and occurred despite unchanged creatinine clearance. In the present study it is plausible to hypothesized an association of decreasing of NTS neuronal development, AT1R/AT2R ratio, and water-electrolyte renal excretion with the higher blood pressure levels found in LP (a taurine-deficient progeny), compared with age-matched NP and LPT offspring.

**Keywords:** Hypertension; protein malnutrition; amino acids ; renin-angiotensin system; solitary nucleus.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

11 $\beta$  HSD2 – 11-beta-hidroxiesteróide-dehidrogenase tipo 2

AngII – Angiotensina II

ANSR – Atividade neural simpática renal

Ap – Área postrema

Arc – Núcleo arqueado

AT1R – Receptor de angiotensina tipo 1

AT2R - Receptor de angiotensina tipo 3

AT4R – Receptor de angiotensina tipo 4

AVP – Vasopressina

BST – Núcleo da estria terminal

CCr – Clearance de creatinina

CVLM – Área ventrolateral caudal do bulbo

Dahl-S – Ratos sensíveis ao sal

DMV – Núcleo motor dorsal do vago

ECA – Enzima conversora da angiotensina

FEK<sup>+</sup> – Fração de excreção de potássio

FENa<sup>+</sup> – Fração de excreção de sódio

FEPNa<sup>+</sup> – Fração de excreção proximal de sódio

FEPPNa<sup>+</sup> – Fração de excreção pós-proximal de sódio

FHR – Ratos com hipertensão induzida por frutose

HHPA- Eixo hipocampo-hipotalamo-pituitaria-adrenal

IUGR (intrauterine growth restriction) – restrição de crescimento intra-uterino

JAK2 - Janus kinase

LO – Núcleo do trato olfatório lateral

LP – Mãe que recebeu ração hipoproteica durante a gestação ou a prole oriunda desta mãe.

LPB – Núcleo para-braquial lateral

LPT – Mãe que recebeu ração hipoproteica suplementada com taurina durante a gestação ou a prole oriunda desta mãe.

LS – Septo lateral

ME – Eminência media

MmPO – Núcleo pré-óptico mediano

NHE3 – isoforma 3 do trocador sódio-hidrogênio

NHm – Núcleo habenular medial

NMDV – Núcleo motor dorsal do vago

NO – Óxido nítrico

NP – Mãe que recebeu ração normoproteica durante a gestação ou a prole oriunda desta mãe.

nPV – Núcleo paraventricular

NTS – Núcleo trato solitário

NTS-C – Núcleo trato solitário - parte caudal

NTS-M – Núcleo trato solitário - parte medial

NTS-R – Núcleo trato solitário - parte rostral

OB – Bulbo olfatório

OCV – Órgão circuventricular

OVLT – Órgão vascular da lamina terminal

PAC – Pressão arterial caudal

PC – Plexo coróide

Pe – Núcleo peri-ventricular

PPVN – Neurônios parvocelulares

SC – Colículo superior

SFO – Órgão subfornical

SN – Substância negra - parte compacta

SON – Núcleo supra-óptico

RCIU – Restrição do crescimento intrauterino

RHR – Ratos com hipertensão renovascular

RVLM – Área ventrolateral rostral do bulbo

SFO – Subfornical órgão

SHR – Rato espontaneamente hipertenso

SHRSP – Uma variação do SHR

SNC – Sistema nervoso central

SNS – Sistema nervoso simpático

SOCS – Suppressor of cytokine signalling

SRA – Sistema renina-angiotensina

SRAA – Sistema renina-angiotensina-aldosterona

STAT – Signal transducer and activator of transcription

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

VEGF-R2 – Um variante do VEGF

VL – Ventrículo lateral

VLG – Núcleo geniculado ventro-lateral.

V – Nervo trigêmeo

IX – Nervo glossofaríngeo

X – Nervo vago



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Diagrama da localização da maioria dos receptores de AT1 em cérebro de mamífero. São mostrados nas áreas pontilhadas dentro do diagrama em corte sagital de cérebro de rato. As áreas marcadas com listras na vertical indicam os órgãos circunventriculares, onde não existe barreira hematocefálica respondendo ao sistema renina-angiotensina periférico. FONTE: Adaptado de McKINLEY et al. 2003.

30

Figura 2. Sistema-renina-angiotensina-aldosterona. AT1R: receptor tipo 1 de angiotensina; AT2R: receptor tipo 2 de angiotensina; AT3R: receptor tipo 3 de angiotensina; AT4R: receptor tipo 4 de angiotensina; AP: aminopeptidases; CP: carboxipeptidases; ECA: enzima conversora de angiotensina; Mas-R: receptor Mas; NaCl: Cloreto de sódio; S.N.S: sistema nervoso simpático; Subst.P: substância P. FONTE: Acta Médica Portuguesa, 2010.

33

Figura 3 – A) Desenho esquemático das vias aferentes e eferentes do núcleo do trato solitário de rato. B) Representação esquemática da superfície dorsal do bulbo do tronco encefálico indicando as diferentes partes do núcleo do trato solitário. FONTE: adaptado de Rubio-Navarro et al. 2011.

37

Figura 4 - Sítios de ação da taurina como um agente hipotensor. FONTE: ABEBE et al., 2011.

42

Figura 5 - Resumo do delineamento experimental

47

Figura 6 - Caixa de aquecimento para aferimento de pressão arterial

50

Figura 7 - Aparelho de plestimografia, notar animal posicionado na câmara para aferição da pressão arterial.

50

Figura 8 - Ganho de peso (g) ao longo das 3 semanas de gestação de ratas Wistar Hannover submetidas à dieta normoprotéica (17%), hipoprotéica (6%) e hipoprotéica suplementada com 2,5% de taurina (6%+Tau).

64

Figura 9 – Massa corporal dos filhotes machos com 1 dia de vida submetidos à dieta com 17%, 6% e 6% de proteína + 2,5% de taurina durante período gestacional.

65

Figura 10 – Massa corporal dos filhotes machos com 12 dias de vida submetidos à dieta com 17%, 6% e 6% de proteína + 2,5% de taurina durante período gestacional.

66

Figura 11 – Massa corporal dos filhotes machos com 16 semanas de vida submetidos à dieta com 17%, 6% e 6% de proteína + 2,5% taurina de durante período gestacional.

66

Figura 12– Massa corporal dos filhotes machos a partir da 6ª semana de vida submetidos à dieta com 17%, 6% e 6% de proteína + 2,5% taurina de durante período gestacional.

67

Figura 13 - Pressão sanguínea sistólica (mmHg) ao longo da idade em semanas.

69

Figura 14 - Estimativa de filtração glomerular pelo *clearance* de creatinina.

71

Figura 15 - Excreção fracional urinária de sódio ( $FE_{Na^+}$ ).

71

Figura 16 - Fração de excreção proximal de sódio ( $FEP_{Na^+}$ ).

72

Figura 17 - Fração de excreção pós-proximal de sódio ( $FEPP_{Na^+}$ ).

72

Figura 18 – Fração de excreção de potássio ( $FEK^+$ ).

72

Figura 19 – Massa do tronco encefálico de filhotes de 12 dias e 16 semanas de vida.

74

Figura 20 – Massa do tronco encefálico de filhotes de 12 dias e 16 semanas por 100 gamas de massa corpórea.

75

Figura 21 – Número de núcleos totais do tronco encefálico de filhotes machos com 12 dias e 16 semanas.

76

Figura 22 – Número de núcleos totais por miligramas de massa do tronco encefálico de animais de 12 dias e 16 semanas.

77

Figura 23 – Número de núcleos de neurônios por miligramas de massa do tronco encefálico de animais de 12 dias e 16 semanas.

78

Figura 24 – Número de núcleos de neurônios por miligrama de massa do tronco encefálico de animais de 12 dias e 16 semanas.

79

Figura 25 – Expressão dos receptores AT1 em tronco encefálico de animais com 12 dias de vida.

80

Figura 26– Expressão dos receptores AT1 em tronco encefálico de animais com 16 semanas de vida.

80

Figura 27 – Expressão dos receptores AT2 em tronco encefálico de animais com 12 dias de vida.

81

Figura 28 – Expressão dos receptores AT2 em tronco encefálico de animais com 12 dias de vida.

81

Figura 29 – Imunoistoquímica para localização do receptor AT1 em corte transversal do bulbo do tronco encefálico de animal de 16 semanas.

83

Figura 30 – Imunoistoquímica para localização do receptor AT2 em corte transversal do bulbo do tronco encefálico de animal de 16 semanas

84

Figura 31 – Imunoistoquímica para localização do receptor AT1 em corte transversal do bulbo do tronco encefálico de animal de 16 semanas. Imagens ampliadas da parte medial do núcleo do trato solitário, NTS-M. Grupo NP figura A, Grupo LP figura B e grupo LPT figura C. As setas apontam para neurônios do NTS.

85

Figura 32 – Imunoistoquímica para localização do receptor AT2 em corte transversal do bulbo do tronco encefálico de animal de 16 semanas. Imagens ampliadas da parte medial do núcleo do trato solitário, NTS-M. Grupo NP figura A, Grupo LP figura B e grupo LPT figura C. As setas apontam para neurônios do NTS.

86

Tabela 1 - Comparando as diferentes intensidades de marcação dos receptores AT1 e AT2 do grupo LP e LPT contra o grupo NP, encontrados no núcleo do trato solitário de filhotes machos com 16 semanas de vida.

87

## LISTA DE ANEXOS

Anexo I – Composição da dieta normoproteica (NP).

132

Anexo II – Composição da dieta hipoproteica (LP).

133

Anexo III – Composição da dieta hipoproteica acrescida de taurina (LPT).

134

Anexo IV – Esquema utilizado para a realização dos cortes histológicos do tronco encefálico para a realização da imunoperoxidase para localizar o NTS.

135

Anexo V – Esquema utilizado para a realização dos cortes histológicos do tronco encefálico para a realização da imunoperoxidase para localizar a parte caudal do NTS.

136

Anexo VI – Esquema utilizado para a realização dos cortes histológicos do tronco encefálico para a realização da imunoperoxidase para localizar a parte caudal do NTS.

137

Anexo VII – Esquema utilizado para a realização dos cortes histológicos do tronco encefálico para a realização da imunoperoxidase para localizar a parte rostral do NTS.

138

Anexo VIII – Esquema do interior da câmara de Neubauer.

139

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1 ANIMAIS	48
3.2 MASSA CORPORAL TOTAL	49
3.3 PRESSÃO ARTERIAL CAUDAL (PAC)	49
3.4 ESTUDO DA FUNÇÃO RENAL	51
3.5 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE SÓDIO, LÍTIO, POTÁSSIO E CREATININA PLASMÁTICA E URINÁRIAS	52
3.5.1 FÓRMULAS PARA CÁLCULO DO CLEARANCE E DE FRAÇÃO DE EXCREÇÃO	53
3.5.1.1 CLEARANCE DE CREATININA (CCR)	53
3.5.1.2 FRAÇÃO DE EXCREÇÃO DE SÓDIO (FENA)	53
3.5.1.3 FRAÇÃO DE EXCREÇÃO DE POTÁSSIO (FEK)	54
3.5.1.4 FRAÇÃO DE EXCREÇÃO PROXIMAL DE SÓDIO (FEPNa)	54
3.5.1.5 FRAÇÃO DE EXCREÇÃO PÓS-PROXIMAL DE SÓDIO (FEPPNa)	54
3.5.1.6 FRAÇÃO DE EXCREÇÃO PÓS-PROXIMAL DE SÓDIO (FEPPNA)	55

3.6 FRACIONAMENTO ISOTRÓPICO	55
3.6.1 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE NÚCLEOS	56
3.6.1.1 CÁLCULO DA ESTIMATIVA DO NÚMERO TOTAL DE NÚCLEOS	57
3.6.2 ESTIMATIVA DO NÚMERO TOTAL DE NÚCLEOS DE NEURÔNIOS	57
3.6.2.1 CALCULO DA ESTIMATIVA DO NÚMERO TOTAL DE NEURÔNIOS	58
3.7 COLETA, IMUNOPRECIPITAÇÃO E IMUNOBLOTTING	59
3.8 IMUNOISTOQUÍMICA	61
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS	62
4. RESULTADOS	63
4.1 ACASALAMENTO E LAVADO VAGINAL	63
4.2 COMPILAÇÃO DOS DADOS REFERENTE AO GANHO DE PESO DURANTE A GESTAÇÃO	63
4.3 COMPILAÇÃO DOS DADOS REFERENTE MASSA CORPORAL	64
4.4 PRESSÃO ARTERIAL CAUDAL (PAC)	67
4.5 FUNÇÃO RENAL	69
4.6 COMPILAÇÃO DOS DADOS REFERENTE AO FRACIONAMENTO ISOTRÓPICO	73



4.7 FRACIONAMENTO ISOTRÓPICO	73
4.8 MASSA DO TRONCO ENCEFÁLICO	74
4.9 NÚMERO DE NÚCLEOS TOTAIS DO TRONCO ENCEFÁLICO	75
4.10 NÚMERO DE NÚCLEOS DE NEURÔNIOS DO TRONCO ENCEFÁLICO	77
4.11 COMPILAÇÃO DOS DADOS REFERENTE AO WESTERN BLOTTING E A IMUNOISTOQUÍMICA	79
4.12 WESTERN BLOTTING	80
4.13 IMUNOISTOQUÍMICA	82
5. DISCUSSÃO	88
6. CONCLUSÃO	107
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
8. ANEXOS	132

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, um conjunto crescente de evidências tem sustentado a ideia de que distúrbios ocorridos em períodos críticos do desenvolvimento *in útero* podem determinar alterações permanentes na fisiologia e/ou morfologia de órgãos e sistemas (ASHTON, 2000). Sustentados por estas evidências, foi determinado o conceito de “programação fetal” e diversas investigações, tanto em humanos quanto experimentais demonstram relação direta com a vulnerabilidade em desenvolver doenças na idade adulta (Lucas, A. 1992; LANGLEY-EVANS, 2001; EERO KAJANTIE et al. 2005). A desnutrição pré-natal é o modelo mais extensamente estudado de programação fetal e tem sido utilizado como uma das chaves para entender a origem de doenças relacionadas à hipertensão arterial e outras desordens (LANGLEY-EVANS, 1998; EDWARDS et al. 2001). De acordo com essa teoria, alterações no estado nutricional materno reduz a atividade da 11 $\beta$ -hidroxisteroide dehidrogenase tipo 2 placentária (11 $\beta$ -HSD-2), expondo o feto a níveis aumentados de glicocorticoide materno refletindo no peso ao nascer da prole (LANGLEY-EVANS, 1997), o que seria a base para o desenvolvimento da elevação da pressão sanguínea já durante a infância e/ou adolescência e ao estado hipertensivo no adulto (BARKER et al. 1989; LAW et al. 1991; WILLIAMS et al. 1992).

Vários modelos de subnutrição gestacional foram desenvolvidos, nos quais o baixo peso da prole ao nascer estava associado à elevação pressórica na idade adulta (PERSSON e JANSSON, 1992; WOODALL et al. 1996; PRENTICE 1991; GODFREY et al. 1996)., BARKER (1995a; 1995b; 1998).

Barker foi o primeiro a evidenciar a associação entre o peso ao nascer e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares no adulto

As melhores evidências acerca das influências fetais na programação de doenças cardiovasculares bem como de hipertensão arterial, surgiram a partir de trabalhos que empregaram métodos de manipulação da dieta materna de ratos durante a gestação, como meio de induzir restrição proteica. Assim, variações no conteúdo de proteína da dieta foram planejadas para produzir restrição leve (12% de caseína), moderada (9%) e severa (6%) (LANGLEY-EVANS, 1996). Esses experimentos resultaram em alterações variáveis no peso dos recém-natos e no tamanho das placentas. Os animais desenvolveram hipertensão arterial a partir da quarta semana de vida a qual foi mantida até a idade adulta (LANGLEY-EVANS, 1994; 1995). Outros estudos determinaram que uma semana de restrição proteica gestacional (6%) é suficiente para induzir alterações na pressão arterial do adulto (LANGLEY-EVANS et al. 1996b; SAHAJPAL e ASHTON, 2005).

Em ratos, existem evidências de que a função pós-natal do eixo hipocampo-hipotálamo-pituitária-adrenal (HHPA) pode ser alterada por eventos pré-natais (para revisão ver WELBERG E SECKL, 2001). Tais alterações podem ocasionar, no adulto, exposição aumentada cronicamente a glicocorticoides (GC) ou exacerbação na resposta ao stress.

Embora o controle de excreção de água e eletrólitos no corpo seja realizado pelos rins, eles não fazem isso sozinho. Tais excreções são reguladas por descargas neurais e hormonais a partir do cérebro. Muitos investigadores têm demonstrado que as funções de diferentes áreas do SNC tais como hipotálamo posterior (NOVAKOVA e STEVENSON, 1971), tronco encefálico (WISE e

GANONG, 1960) e núcleos da parede anterior do terceiro ventrículo (DORN et al. 1970), modificam a excreção renal de sódio e potássio (BOURQUE, 2008)

Diversas regiões neurais estão envolvidas na regulação do sistema cardiovascular, particularmente na conversão de barorreflexos (HUANG e JOHNS, 2000).

O sistema renina angiotensina (SRA) medeia o controle pressórico e, desde 1986 (BARKER E OSMOND), quando o conceito da origem desenvolvimentista da saúde e da doença (DOHaD) durante a vida intrauterina (ou em períodos iniciais do nascimento) foi estabelecido, o desenvolvimento do SRA tem atraído a atenção dos pesquisadores. Diversos estudos sobre a participação deste sistema na programação fetal tem sido feitos (FITZSIMONS, 1998) e progressos recentes tem demonstrado sua importância, tanto no período fetal quanto no pós-natal, em modelos de programação fetal.

Os receptores AT1 são os principais mediadores das respostas à angiotensina II e são encontrados em maior densidade em neurônios localizados nos núcleos supraótico e paraventricular, na lâmina terminal e o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) (GROB MAGALI et al., 2003), no núcleo parabraquial lateral, no núcleo do trato solitário e na medula ventrolateral (WANG Et Al., 2008), (Figura 1). Estas regiões são conhecidas por seu papel na regulação do sistema cardiovascular e/ou balanço hidroeletrolítico corporal (BOURQUE, 2008).

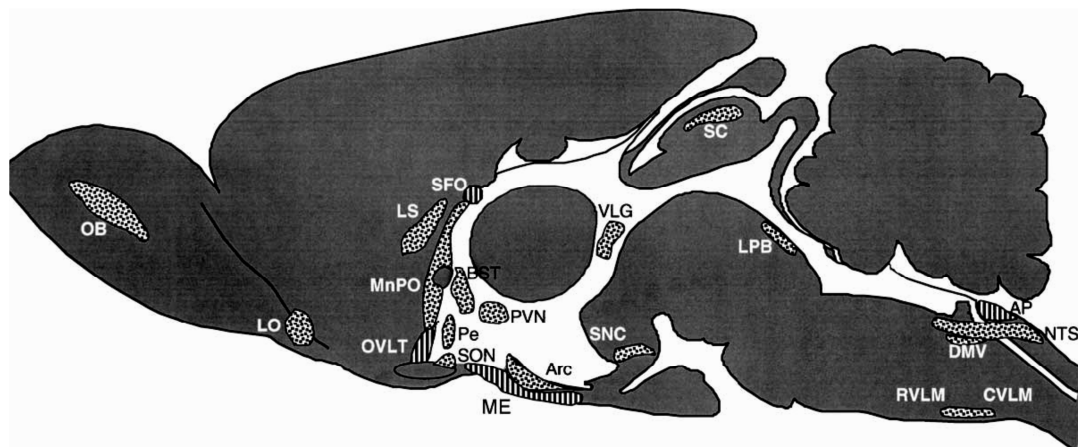


Figura 1. Diagrama da localização da maioria dos receptores de AT1 em cérebro de mamífero. São mostrados nas áreas pontilhadas dentro do diagrama em corte sagital de cérebro de rato. As áreas marcadas com listras na vertical indicam os órgãos circunventriculares, onde não existe barreira hematocefálica respondendo ao sistema renina-angiotensina periférico.

Abreviações: Arc, núcleo arqueado; Ap, área postrema; BST, núcleo da estria terminal; CVLM, medula ventro-lateral caudal; DMV, núcleo motor dorsal do vago; LPB, núcleo para-braquial lateral; LO, núcleo do trato olfatório lateral; LS, septo lateral; ME, eminência média; MnPO, núcleo pré óptico mediano; NTS, núcleo do trato solitário; OB, bulbo olfatório; OVLT, órgão vascularizado da lâmina terminal; Pe, núcleo peri-ventricular; RVLM, medula ventro-lateral rostral; SC, colículo superior; SFO, órgão subfornical; SN, substância negra - parte compacta; SON, núcleo supra-óptico; VLG, núcleo geniculado ventro-lateral. (Adaptado de McKINLEY et al., 2003).

Alguns neurônios do órgão subfornical (SFO), do OVLT do núcleo pré-óptico, que apresentam RNAm para AT1, possuem conexões polissinápticas com

órgãos periféricos como rins, via inervação simpática renal (McKINLEY, 2001, KRAUSE et al., 2008; BOURQUE et al, 2007, SHI et al., 2005). Em ratos anestesiado, a infusão intracerebroventricular (ICV) de AngII aumenta a atividade neural simpática renal (ANSR) (HUANG & LEENEN, 1996).

Contrariamente em ratos, coelhos ou cabras conscientes tal infusão provoca grande e longa depressão na ANSR (Dorward & Rudd, 1991; Kannan, Nakamura, Jin, Hayashida, & Yamashita, 1991; May & McAllen, 1997a) Dorward PK, Rudd CD.

Este efeito foi paralelamente independente da ativação de barorreceptores a qual resultou do aumento da pressão arterial causada pela Angio II injetada centralmente (Dorward & Rudd, 1991; May & McAllen, 1997a).

Provavelmente, receptores AT1 medeiam esta inibição da RSNA já que a destruição da lâmina terminal abole a depressão na ANSR causada pela infusão ICV de AngII em ratos conscientes (McALLEN, & MCKINLEY, 2000). A infusão ICV de solução hipertônica de NaCl também inibiu a RSNA em cabras conscientes, mas aumentou-a em ratos anestesiados. Estes dois efeitos foram bloqueados por losartan, administrado centralmente (CHEN & TONEY, 2001; MAY & MCALLEN, 1997b), sugerindo que a AngII endógena neural pode influenciar a ANSR. No adulto, a expressão de AT2R ocorre predominantemente no *locus caeruleus*, partes ventral e dorsal do septo lateral, no colículo superior, núcleo subtalâmico, em muitos núcleos do tálamo e núcleos olivares inferiores. No córtex cingulado, no córtex e na camada molecular do cerebelo, no colículo superior e

núcleos paraventriculares são encontrados tanto receptores AT1 como AT2 (MILLAN et al, 1991;. TSUTSUMI E SAAVEDRA, 1991; LENKEIETAL, 1996,. 1997).

## SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA

A atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) caracteriza-se por estar associada a uma cascata de eventos envolvidos no controle da pressão arterial e do equilíbrio hidroeletrolítico. A disfunção do SRAA desempenha papel importante na patogênese de doenças renais, cardiovasculares e na hipertensão arterial (GUESTA et al. 2010).

Os principais elementos da cascata englobam o angiotensinogênio, a renina, a angiotensina I (AngI), a enzima conversora de angiotensina (ECA) e a angiotensina II (AngII).

De acordo com a literatura, quando a pressão e/ou o fluxo sanguíneos estão reduzidos na arteríola aferente glomerular, um grupo de células específicas do aparelho justaglomerular secreta renina na corrente sanguínea. Essa enzima cliva o decapeptídeo angiotensinogênio que dará origem a angiotensina I. Quando a angiotensina I passa pelos capilares dos pulmões, e de outros órgãos, uma enzima conversora da angiotensina (ECA) remove dois aminoácidos, formando um octapeptídeo denominado angiotensina II., Condições de privação de sal, volume sanguíneo baixo e hipertensão arterial provocam o aumento da produção de angiotensina II no sangue (FOX, 2007).

A angiotensina II é uma potente reguladora da pressão arterial e da homeostasia provocando: 1) vasoconstrição, 2) liberação do hormônio vasopressina (AVP) pela neurohipófise levando ao aumento da reabsorção de água pelos coletores renais e, 3) liberação de aldosterona pelo córtex da suprarrenal aumentando a reabsorção de sódio e água pelo nefron pós-proximal. (CONTRA et al. 2008; SANTOS e SAMPAIO, 2002; Ribeiro e Florêncio, 2000). A AngII é um octapéptideo [Ang(1-8)] biologicamente ativo podendo ser formada no pulmão e localmente em vários tecidos (rins, coração, cérebro, adrenais e vasos) e sua meia-vida é curta (aproximadamente 2 minutos). Recentemente foi demonstrada a existência de um heptapeptídeo [Ang(1-7)], formado a partir da AngI pela clivagem da porção C-terminal da AngII, por ação de carboxipeptidases, enzima como alta homologia estrutural com a ECA, designada ECA2. Ao contrário da ECA, esta enzima leva à formação de Ang[1-7], cujo efeitos é predominantemente vasodilatador, agindo via aumento da sensibilidade de barorreceptores e vasodilatação periférica (CASTRO et al. 2005; LAGRANHA et al. 2007; GUESTA et al. 2010) (Figura 2).

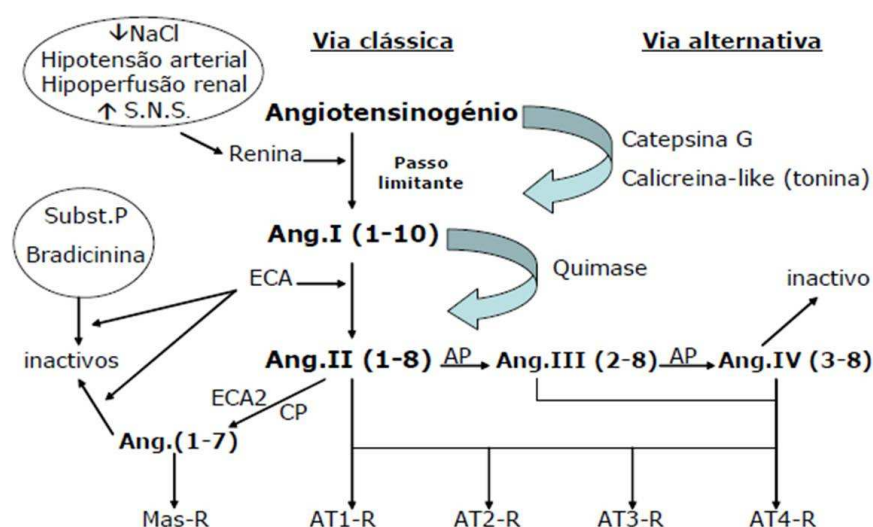




Figura 2 - Sistema-renina-angiotensina-aldosterona. AT1R: receptor tipo 1 de angiotensina; AT2R: receptor tipo 2 de angiotensina; AT3R: receptor tipo 3 de angiotensina; AT4R: receptor tipo 4 de angiotensina; AP: aminopeptidases; CP: carboxipeptidases; ECA: enzima conversora de angiotensina; Mas-R: receptor Mas; NaCl: Cloreto de sódio; S.N.S: sistema nervoso simpático; Subst.P: substância P. FONTE: Acta Médica Portuguesa, 2010.

Dentre outros, os efeitos vasoconstritores da Ang II devem-se à sua ligação aos receptores tipo 1, porém, já foram identificados outros quatro tipos diferentes de receptores de angiotensina. Os receptores tipo 1 (AT1R) medeiam a maioria dos efeitos atribuídos a Ang II. A ligação da Ang II à estes receptores, amplamente distribuídos pelo organismo, resulta em vasoconstrição, inflamação, aumento do estresse oxidativo, e estimulação da atividade do sistema nervoso simpático (SNS). Nos rins a ligação da Ang II aos AT1R, promove diretamente aumento da reabsorção de sódio no tubo proximal; inibição da liberação da renina; vasoconstrição arteriolar renal, preferencialmente da arteríola eferente (com consequente aumento da taxa de filtração glomerular e redução do fluxo sanguíneo renal). Indiretamente, via liberação de AVP na neuro-hipófise, e de aldosterona pela zona glomerulosa da adrenal, provoca aumento da reabsorção de água no coletor e de sódio no nefron pós-proximal, respectivamente.

A expressão do receptor de angiotensina tipo 2 (AT2R), é maior no período fetal diminuindo no período pós-natal sendo encontrados em maior quantidade nas artérias aorta e coronária. Seus efeitos fisiológicos são antagônicos aos do receptor AT1 e incluem diversas ações tais como: vasodilatação através da

liberação de óxido nítrico e bradicinina (HANNAN et al. 2003), diminuição da síntese, secreção e liberação de renina (Siragy HM e Carey RM, 1997), inibição da proliferação celular, apoptose da musculatura vascular lisa (HIRIUCHI et al. 1999), apoptose de cardiomiócitos (Daviet et al. 1998), bloqueio das ações dos radicais livres (SCHULMAN IH E RAIJ L. 2008).

De acordo com Giesta (2010), a função dos receptores tipo 3 (AT3R) não está bem esclarecida, mas os receptores tipo 4 (AT4R) induzem a libertação do inibidor 1 de ativador de plasminogênio (IAP-1) através da ligação da Ang II e seus peptídeos N-terminais (Ang III e IV), e estão relacionados aos mecanismos de ansiedade e memória.

McKinley et al. 2003 demonstraram que Ang I, Ang II, Ang III e Ang [1-7] estão presentes no tecido cerebral, embora os dois últimos tenham sido encontrados em concentrações muito baixas. Lind et al. 1948 e Oldfield et al. 1994, identificaram a presença de AngII e AngIII em regiões específicas do cérebro de ratos, principalmente em fibras e nervos terminais (CHAPPELL et al. 1987, 1989).

Assim, sabendo-se que os AT1R são os principais mediadores das respostas à AngII e que o núcleo do trato solitário (NTS) apresenta grande concentração destes receptores, a programação fetal do SRA nesta estrutura neural, poderia estar envolvida nos distúrbios cardiovasculares e pressóricos na idade adulta.

## NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO

O núcleo do trato solitário está localizado na área bulbar do tronco cerebral (figura 3). Tomando como referência o vértice da cabeça situa-se na parte rostral entre as coordenadas -11,28mm e - 15.96mm posterior ao bregma (PAXINOS E WATSON, 2005). A coluna somatossensorial dos nervos trigêmeo e glossofaríngeo esta adjacente ao NTS; dorsalmente ao NTS encontram-se os nervos vestibulares lateral e medial, e ventralmente a ele, está o núcleo reticular parvocelular. Em ratos, o NTS é considerado como uma estação de integração de uma vasta e complexa gama de informações. Para fins de pesquisa ele foi dividido em três partes: 1) a parte mais rostral (NTS-R), majoritariamente recebe informações aferentes viscerais dos receptores gustatórios da língua e da epiglote via nervos facial, glossofaríngeo e vago; 2) a parte medial (NTS-M), também chamada de intermediária; 3) a parte caudal (NTS-C), também denominada comissural. Tanto NTS-M quanto o NTS-C recebem informações dos nervos glossofaríngeo (IX), vago (X) e trigêmeo (V) os quais são responsáveis pelas informações viscerais gerais, incluindo informações oriundas dos quimiorreceptores (IX), barorreceptores (X) receptores de distensão pulmonar (X) receptores intestinais (X), e mecanoreceptores (V) (BECKSTEAD E NORNGREN 1979; HAMILTON e NORNGREN, 1984; WHITEHEAD, 1986; CHAN e SAWCHENKO, 1998; ZHANG e ASHWELL, 2001).

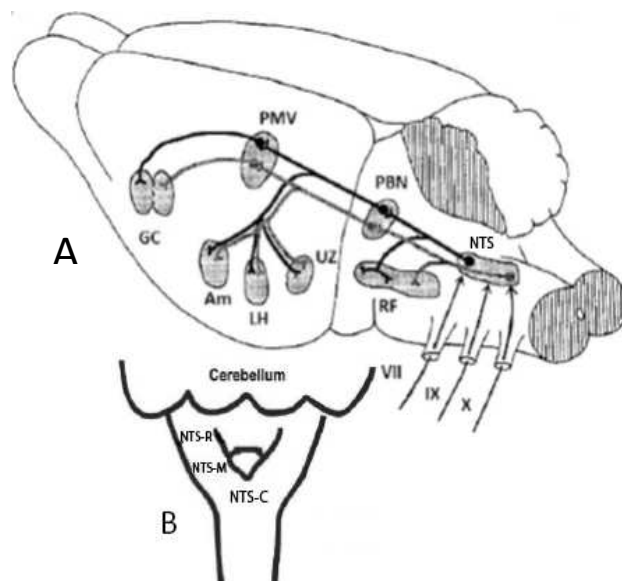


Figura 3 – A) Desenho esquemático das vias aferentes e eferentes do núcleo do trato solitário de rato. VII, nervo facial; IX, nervo glossofaríngeo; X, nervo vago; NTS, núcleo do trato solitário; RF, formação reticular; PBN, núcleo parabraquial; UZ, zona incerta. LH, hipotálamo lateral; Am, amígdala; PMV núcleo talâmico ventral posteromedial; GC, córtex gustatório insular. B) Representação esquemática da superfície dorsal do bulbo do tronco encefálico indicando as diferentes partes do núcleo do trato solitário. NTS-R, NTS-M e NTS-C; respectivamente representam a parte rostral, medial (intermediária) e caudal (comissural) do núcleo do trato solitário. (Adaptado de Rubio-Navarro et al. 2011).

O NTS é a grande central inicial de processamento das informações que chegam ao cérebro sobre a pressão arterial, a frequência cardíaca, o enchimento venoso, a atividade cardíaca, o estado da árvore pulmonar, e composição química do sangue. A partir dele, a informação devidamente processada e analisada irá circular pelo encéfalo, em particular nas áreas ventrais do bulbo e no hipotálamo

(LOPES et al, 2001). As áreas ventrais do bulbo espinal são divididas em três. A área rostro ventrolateral (RVLM) (GUERTZENSTEIN, 1973; GUERTZENSTEIN e SILVER 1974), embora não seja a única é a mais importante origem do tônus simpático. A área caudoventrolateral (FELDBERG e GUERTZENSTEIN, 1976; GUERTZENSTEIN E LOPES, 1984), localiza-se abaixo da precedente, e está envolvida em todos os reflexos cardiovasculares, exercendo um controle tônico e fásico sobre a RVLM. A terceira área é conhecida como área pressora caudal (FELDEBERG e GUERTZENSTEIN, 1986).

Vários estudos demonstram a extrema importância do NTS no controle cardiovascular. A lesão eletrolítica unilateral do NTS intermediário de gatos abole as respostas reflexas da pressão arterial e da frequência cardíaca produzidas pela estimulação elétrica do nervo do seio carotídeo ou, em resposta à ativação química do corpo carotídeo, ipsilateral à lesão, sugerindo ausência de segregação topográfica de baro e quimiorreflexo no NTS de gatos (MIURA e REIS, 1974). Fato interessante é que, enquanto a simples denervação sinoaórtica é incapaz de promover hipertensão crônica, a destruição do NTS desencadeia hipertensão (Campos Jr et al. 2001) Portanto o NTS é o ponto primário das aferências cardiovasculares e respiratórias, integrando sinais no ajuste da eferência simpática e parassimpática.

Assim explorar as possíveis alterações morfológicas do tronco encefálico bem como, a expressão dos receptores de angiotensina II AT1R e AT2R no NTS de animais LP, pode trazer importantes informações sobre como os mecanismos

envolvidos na programação fetal que leva ao desenvolvimento da hipertensão arterial nestes animais.

## IMPORTÂNCIA DO AMINOÁCIDO TAURINA NA VIDA PRÉ E PÓS-NATAL

A desnutrição e a restrição proteica gestacional levam à redução na disponibilidade de diversos aminoácidos para o embrião e/ou feto. Dentre estes destaca-se a taurina como importante mediador do crescimento da manutenção da homeostase e da pressão arterial. A taurina (ácido 2 – aminoetanosulfônico) é um aminoácido sulfurado livre encontrado em concentrações elevadas no plasma, na retina, nos miócitos cardíacos e esqueléticos, nos leucócitos e muito abundante no SNC de mamíferos (PARCELL,2002). A concentração de taurina nesses órgãos é maior durante o período perinatal, e diminui modestamente com o avanço da idade (STURMAN,1993). Isso porque este aminoácido é essencial para recém-nascidos, sendo fornecido através do leite materno, já que desempenha funções importantes durante o desenvolvimento fetal, e a sua deficiência durante a gestação, esta associada ao retardo no crescimento fetal, degeneração da retina, e disfunção no sistema nervoso central (STURMAN,1993; LOURENÇO et al.,2002; FOSS, et al., 2002).

A taurina é liberada em grandes quantidades no cérebro em condições hiposmótica, privação de energia e por despolarização celular (DELEUZE et al.,1998; BOCKELMANN et al.,1998; COLIVICCHI et al.,1998).

Em situações de estresse metabólico como sepse, traumas e cirurgias, sua concentração no plasma pode diminuir (BIRDSALL,1998; CHIARLA et.al.,2000; SCHULLER-LEVIS et al., 2003).

A síntese de taurina ocorre no fígado a partir dos aminoácidos metionina e cisteína, recentes estudos indicam que a taurina pode ser sintetizada em outros órgão tais como cérebro, rim e tecido adiposo (TAPPAZ et al., 1999; PARK et al., 2002; LI et al., 2006; TSUBOYAMA-KASAOKA et al. 2006).

Várias funções biológicas tem sido atribuídas à taurina, tais como a conjugação dos ácidos biliares, manutenção da homeostase do cálcio (LIU, et.al.,2000), osmorregulação (SCHAFFER et al., 2000), na regulação do sistema cardiovascular e da pressão arterial(TRACTMAN,1988; XU et al, 2008), estabilização das biomembranas reprodução e imunidade (SCHULLER-LEVIS et al. ,2003), atividade antioxidante (NANDHINI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2010). Além disso é um neuromodulador do sistema nervoso central (HUXTABLE,1992), e esta envolvido no desenvolvimento e na função da retina (HEIRD, 2004).

Sugere-se que a maioria dos efeitos atribuídos a taurina são reflexo do seu papel modulador na estrutura e função das biomembranas. A taurina, intracelular, em virtude da sua natureza química, interage eletrostaticamente com grupos polares dos fosfolípidos, com possíveis efeitos sobre a permeabilidade e fluidez das membranas celulares (HUXTABLE, 1992; MCCARTY, 1996; HANSON, 2001). Isto, por sua vez, influencia tanto a estrutura quanto as funções das membranas bem como das proteínas associadas a ela (por exemplo, receptores, proteínas de transporte, canais de íons, proteínas G e enzimas efectoras) podendo torna-las

susceptíveis via modulação das ligações covalente (HUXTABLE, 1992; MCCARTY, 1996; HANSON, 2001).

Tem sido sugerido que devido as suas funções de antioxidante e estabilizadora de membranas celulares a taurina atua na prevenção de lesões teciduais como hemorragia periventricular, retinopatia da prematuridade, doença pulmonar crônica, ou enterocolite necrotizante em prematuros (THIBEAULT, 2000).

Experimentos clínicos têm demonstrado que a taurina atua ainda como reguladora da homeostase de  $\text{Ca}^{+2}$  e inativadora radicais livres (TANG et al., 2000; OLIVEIRA et al. 2010).

OJA e SARANSAARI, (2000), demonstraram que a taurina atua como um neurotransmissor inibitório sendo liberada na fenda sináptica após a hiperestimulação de receptores glutaminérgicos, diminuindo os efeitos excitatórios do glutamato, oferecendo proteção contra excitotoxicidade e prevenindo danos neurais. Assim, a taurina, como o ácido gama-aminobutírico (GABA), são aminoácidos inibitórios (IAAs), que estão presentes em várias partes do sistema nervoso central de vertebrados (DEMEDIUK, et al., 1989).

A taurina pode ser encontrada em neurônios e células da neuroglia apresentando propriedades neuroinibitórias como um agonista parcial da GABA<sub>A</sub> e de receptores da glicina (HAAS E HOSLI 1973; HORIKOSHI et al, 1988;.. HUSSY et al 1997, 2001; JUNYENT et al., 2009). A exposição prolongada a concentrações milimolares, no entanto, produz aumento na função sináptica que não é



estritamente dependente das ações de taurina em receptores ionotrópicos inibitórios (GALARRETA et al 1996; DEL OLMO et al 2000; CHEPKOVA et al 2002;. SERGEEVA et al. 2003).

ABEBE et al (2011) resumiram recentemente os efeitos da taurina, em ratos hipertensos e normotensos, como um agente hipotensor (Figura – 4).

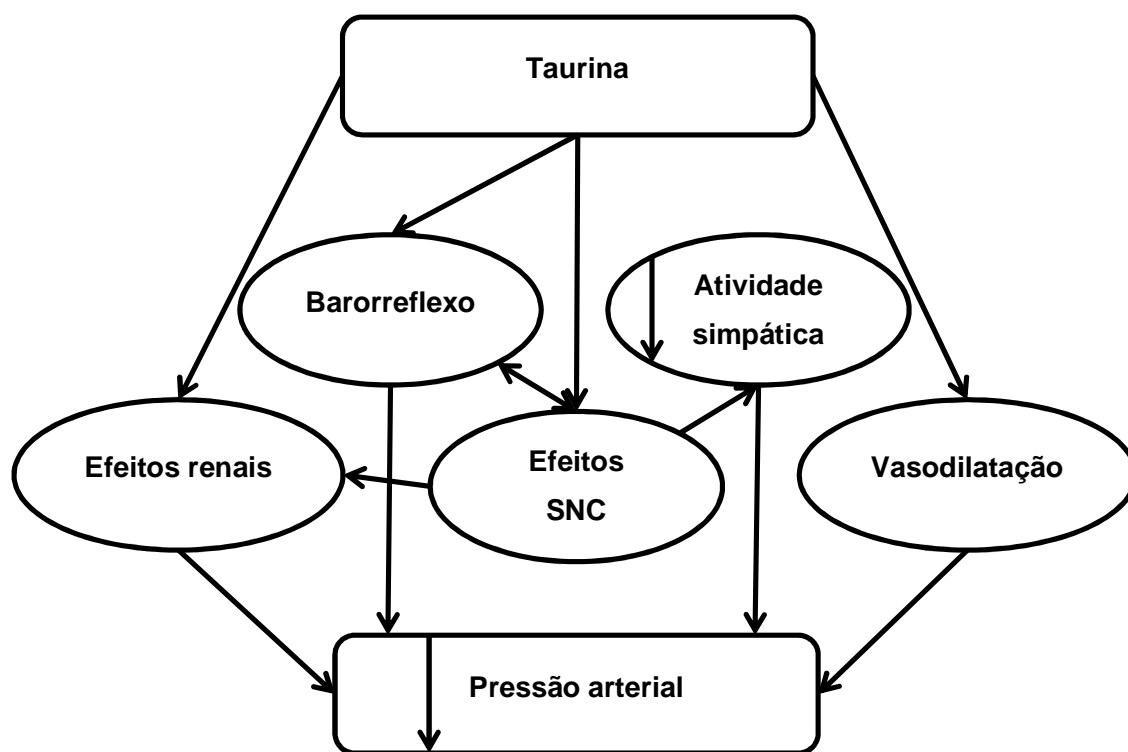


Figura 4 - Sítios de ação da taurina como um agente hipotensor (ABEBE et.al., 2011).

Em ratos adultos espontaneamente hipertensos (SHR) a suplementação com taurina, durante o período perinatal ou no início da vida, impede a hipertensão devido em parte, às suas propriedades antioxidantes (RACASAN et.al, 2004).

Tem sido demonstrado que a depleção perinatal de taurina induz baixo peso ao nascer e danos a múltiplos órgãos. Embora a baixa concentração tecidual e plasmática observada possa estar associada a estes danos os mecanismos subjacentes à sua redução ainda não foram esclarecidos (HUXTABLE, 1992; STURMAN, 1993) Boujendar et al., 2003 acrescentaram 2,5g/l de taurina na água de ratas submetidas a restrição proteica gestacional e observaram que a densidade vascular do pâncreas da prole foi completamente restaurada.

A taurina esta também associada ao crescimento pós-natal embora não sejam conhecidos os mecanismos pelos quais a suplementação com este aminoácido, no final da gestação, acentue o crescimento. A taurina atua primariamente no eixo GH/IGF-1 que é um determinante endócrino para o crescimento longitudinal pós-natal. Tanto em ratos (IKUYAMA et al. 1988) quanto no ser humano (MANTOVANI e DeVIVO, 1979), tem sido demonstrado que a taurina estimula a secreção de GH. A redução na concentração de taurina no leite diminuiu a taxa de crescimento de ratos paralelamente ao decréscimo dos níveis séricos de IGF-I (Hu et al. 2000).

AERTS e VAN ASSCHE, (2002), observaram que a disfunção renal decorrente de, diabetes mellitus, hipertensão, obesidade ou mesmo do envelhecimento é inversamente correlacionada à concentração de taurina no corpo.

Outros estudos têm mostrado que o tratamento oral com taurina modula diretamente a atividade local do RAS em cérebros de SHR (OKAMOTO et

al.,1996). A ingestão de taurina (3% em água) inibe o desenvolvimento de hipertensão induzida pela injeção de renina ou angiotensina II na área de pré-óptica de SHR. Em geral, estes resultados fornecem evidências que a taurina produz efeitos benéficos anti-hipertensivos em SHR, SHRSP (uma variação do SHR) e em ratos WKY. Tal efeito sugere a capacidade da taurina em prevenir diversas doenças cardiovasculares e manter a homeostase (ABEBE et al.,2011).

Tem sido também observado que a suplementação dietética de taurine na alimentação atenua a apoptose e necrose de hepatócito a diferentes fatores agressores e inibe a produção de óxido nítrico em células de glioma.

Levando-se em consideração os achados acima descritos, o presente estudo teve como propósito inicial determinar se a restrição proteica gestacional altera a citometria e a expressão de AT1R e AT2R na prole de ratos machos; os dados obtidos com tal estudo foi comparado àqueles observados em controles adequados pareados pela idade e cujas mães ingeriram uma concentração normal de proteína. Por outro lado, uma vez que estudos têm demonstrado que os níveis de taurina (ácido 2 – aminoetanossulfônico) está marcadamente reduzida no plasma de fetos cujas mães ingerem pouca proteína durante toda a prenhez e, que a suplementação de taurine restaura as concentrações plasmáticas fetais deste aminoácidos será também objeto do presente estudo determinar se a suplementação de taurina a ratas ingerindo dieta hipoprotéica poderia prevenir contra possíveis alterações funcionais cardiovasculares ou renais que culminariam com o desenvolvimento de hipertensão arterial na prole destes animais. Nós também testaremos a hipótese que a restrição proteica

gestacional elevando a pressão arterial, pode decorrer pelo menos em parte, de modificações estruturais e funcionais do trato do núcleo solitário.

## 2 - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Tendo em vista a fundamentação apresentada acima o desenvolvimento do presente projeto se JUSTIFICA pela:

1. Elevada prevalência e morbidade da hipertensão arterial sistêmica em populações humanas;
2. Existência de modelos fisiopatológicos específicos que atendem ao estudo e a compreensão etiopatológica de doenças humanas, tais como a hipertensão arterial e doenças metabólicas;
3. Repercussão pré-natal de eventos que influenciam diretamente a manifestação futura de doenças metabólicas e cardiovasculares;
4. Prevalente desnutrição materno-infantil, com evidentes repercussões sobre a saúde de populações e, a merecida preocupação para o desenvolvimento de políticas de saúde pública que minimizem os efeitos desta em países desenvolvidos e em desenvolvimento;
5. Conhecida repercussão fetal da desnutrição materno-infantil em períodos críticos do desenvolvimento ontogênico, vinculada à manifestação programada de alterações no desenvolvimento morfológico e funcional de órgãos e sistemas;

6. Evidências que tais alterações estão relacionadas a modificações definitivas da modulação do sistema nervoso central. Tais evidências têm estimulado o desenvolvimento de projetos que buscam elucidar os mecanismos biológicos e moleculares envolvidos na gênese destas alterações descritas acima.

Assim, são OBJETIVOS do presente projeto estudar a repercussão do tratamento de ratas prenhas com dieta hipoproteica e hipoproteica suplementada com 2,5% de taurina, comparativamente ao grupo controle:

1. na pressão arterial e função renal da prole adulta;
2. na expressão dos receptores de angiotensina AT1 e AT2 no NTS na prole com 12 dias e 16 semanas de vida;
3. no número de células (totais e neurônios) em áreas específicas do tronco encefálico na prole com 12 dias e 16 semanas de vida.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### **FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL**

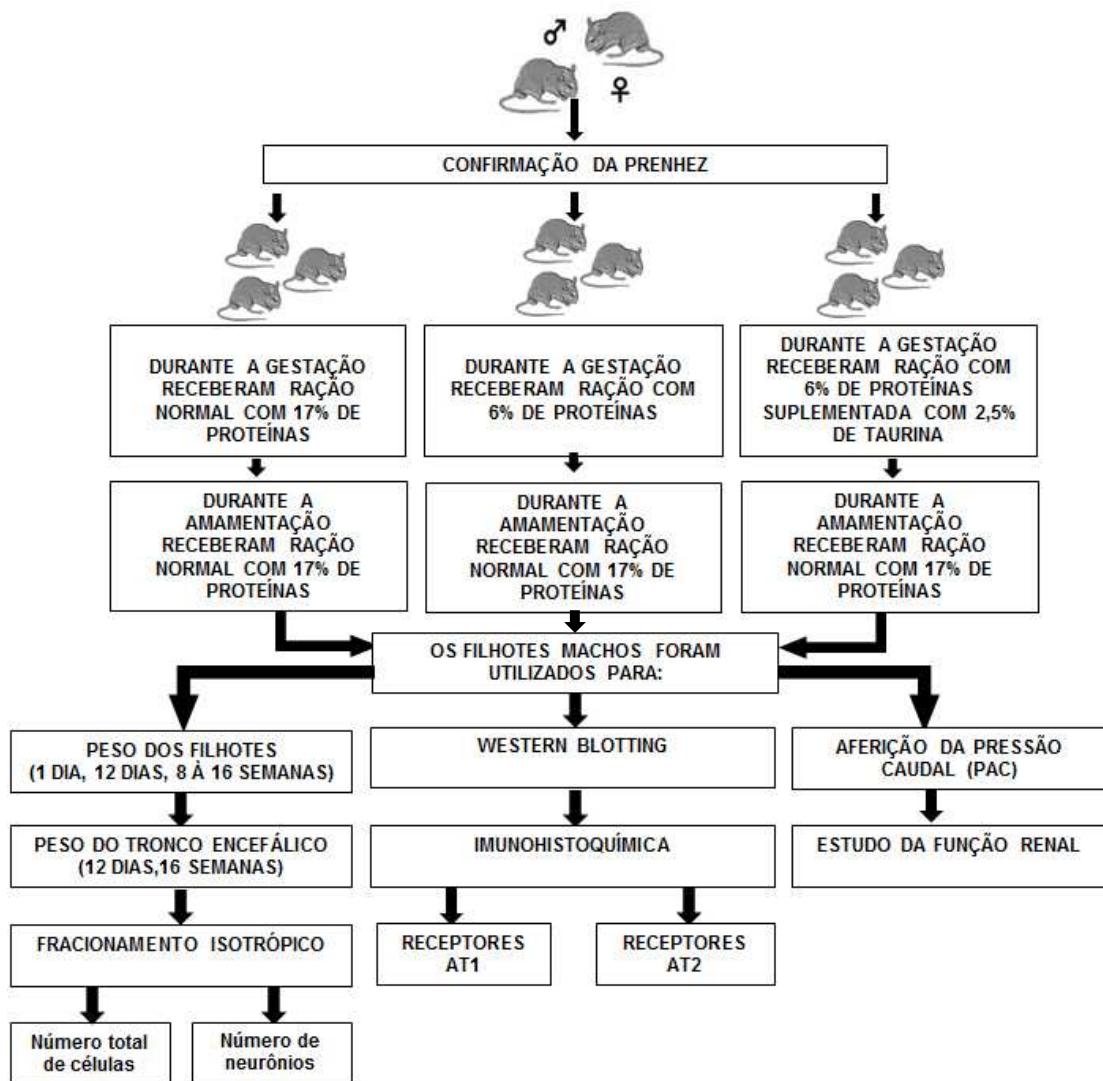


Figura 5 - Resumo do delineamento experimental

### 3.1 ANIMAIS

Os estudos foram realizados em proles de ratas Wistar-Hannover, fornecidas pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. Todos procedimentos experimentais com os animais foram realizados em consonância com os princípios éticos na experimentação animal, sendo a pesquisa submetida e aprovada pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal CEEA/UNICAMP, protocolo no 2575-1. Durante todo experimento os animais foram mantidos em sala com temperatura (25°. C) e umidade controladas, com ciclo de luz de 12h claro/12h escuro. Após o desmame com 3 semanas de vida, as fêmeas passaram a ser alimentadas com dieta padrão para roedores isocalóricas e normossódicas (Nuvital, Curitiba, PR, Brasil com conteúdo de Na<sup>+</sup>: 135 ± 3 µEq/g; e K<sup>+</sup>: 293 ± 5 µEq/g). Ao atingirem 12 semanas de vida, estas foram acasaladas em sistema de harem, por 12 horas, em ambiente escuro e depois separadas. A presença de espermatozoides no lavado vaginal foi utilizada como indicativo de prenhez. Após constatação da prenhez, as fêmeas passaram a ser alimentadas com dieta padrão para roedores isocalóricas e normossódicas (com conteúdo normal de proteína (NP), 17% de proteína), baixo conteúdo proteico (LP) (6% de proteína) ou baixo conteúdo proteico adicionada com taurina a 2.5% (LPT). Os diferentes tipos de ração definidos acima foram oferecidos as fêmeas *ad libitum* durante toda prenhez. As dietas foram confeccionadas no laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo (Prof. Dr. Antônio Carlos Bosqueiro) do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Unicamp.

## Grupos Experimentais

a) Grupo controle de acasalamento: 6 ratas Wistar-Hannover receberam durante o período gestacional a dieta normoprotéica 17% (NP) de proteínas (vide anexo I).

b) Grupo experimental I de acasalamento: 7 ratas Wistar receberam durante o período gestacional a dieta hipoproteica 6% (LP) (vide anexo II).

c) Grupo experimental II de acasalamento: 7 ratas Wistar receberam durante o período gestacional a dieta hipoproteica 6% (LPT) de proteínas suplementada com 2,5% de taurina (vide anexo III).

## 3.2 MASSA CORPORAL TOTAL

Todos os animais (mães e prole de machos) foram pesados para acompanhamento da evolução da massa corporal ao longo do experimento. Para a aferição da massa corporal das mães, o procedimento de pesagem foi realizado durante todo o período gestacional. Com relação a prole de machos a massa corporal total foi aferida no dia do nascimento e semanalmente, a partir da 5ª semana até a 16ª semana de vida.

## 3.3 PRESSÃO ARTERIAL CAUDAL (PAC)



Dezoito ratos machos (prole): grupos controle (NP, n=6), grupo experimental I (LP, n=6) e grupo experimental II (LPT, n=6), passaram pelo procedimento de aferição da pressão sistólica utilizando a técnica de pletismografia de cauda a partir da 6 semana de vida. A pletismografia de cauda consiste de técnica baseada originalmente descrita por BYRON e WILSON (1938) e por WILLIAMS et al. (1939). Antes do procedimento em si, os ratos foram colocados em uma caixa pré-aquecida ( $\approx 32^{\circ}\text{C}$ ) e deixados por 10 minutos (figura 6). Após o aquecimento, os ratos foram colocados dentro de um suporte fixo de acrílico (contentor) para a imobilização (figura 7). Uma balsa inflável com transdutor foi colocada e posicionada na porção proximal da cauda.



Figura 6 - Caixa de aquecimento para aferimento de pressão arterial

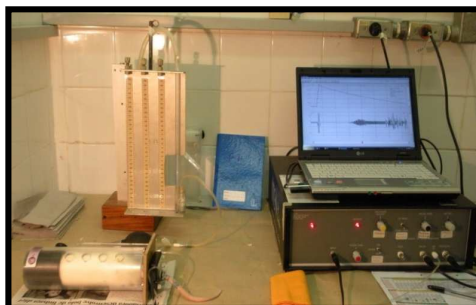


Figura 7 - Aparelho de pletismografia, notar animal posicionado na câmara para aferição da pressão arterial.

A pressão na bainha pneumática, a qual é conectada um manômetro de mercúrio, foi elevada à 250mmHg para que a pressão sistólica até que houvesse a interrupção total do fluxo sanguíneo arterial. Em seguida a pressão era lentamente liberada e a pressão arterial aferida através de coluna de mercúrio e graficamente pelo software do aparelho Automatic Cuff Inflation Pump, ITC Life Science Inc®. Os cuidados na aferição da pressão arterial seguiram os preceitos definidos por LOVEMBERG, 1987. Para cada rato, a pressão arterial foi aferida em triplicata e, então se fez necessário a análise estatística pela análise de variância. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando  $p < 0.05$ .

### 3.4 ESTUDO DA FUNÇÃO RENAL:

Para avaliação da função renal foi utilizado o método de clearances de creatinina e de lítio em animais acordados, na 8ª e 16ª semana de vida, sempre no dia após a verificação da pressão arterial.

Quinze horas antes do início da coleta de urina, os animais receberam uma dose de cloreto lítio (Synth) por gavagem (introdução de uma sonda gástrica através da cavidade oral), na concentração de 0.06mEq/100g do peso corporal. A ração foi retirada *overnight* e os animais permaneceram em jejum sólido com livre acesso a água. Com uma hora e vinte minutos antes do início da coleta, foi administrada por gavagem uma sobrecarga hídrica no volume de 5% peso corporal que foi repetida vinte minutos antes do início das coletas de urina. Após as gavagens os animais, foram então colocados em gaiolas metabólicas

individuais. Passado o intervalo de 20 minutos, deu-se início a coleta de urina em tubos graduados de vidro durante 2 horas exatas, divididos em duas coletas de 1 hora cada. Os volumes foram anotados e a urina homogeneizada, centrifugada, foi congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posteriores dosagens. Após anestesia com 75mg/kg de ketamina e 10mg/kg de xilasina os animais foram submetidos à coleta de sangue através de vasos da cauda. Foram coletados sangue em tubos heparinizados (0,02 mL). As amostras de sangue, já identificadas, foram centrifugadas (5000 RPM) e os sobrenadante congelado  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior dosagem.

Os parametros funcionais do rim avaliados foram: volume urinário, clearance de creatinina, fração de excreção de sódio, fração de excreção proximal e pós-proximal de sódio e fração de excreção de potássio.

### 3.5 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE SÓDIO, LÍCIO, POTÁSSIO E CREATININA PLASMÁTICA E URINÁRIAS

As concentrações plasmáticas de sódio, lítio e potássio foram determinadas por fotometria de chama (Micronal, B262, São Paulo, Brasil). A creatinina plasmática e urinária foi determinada pelo método colorimético utilizando-se um espectofotômetro Micronal (Modelo 383, São Paulo). Os metais alcalinos quando elevado a um temperatura alta, absorvem energia da fonte de calor e passam ao estado de excitação em sua forma atômica. Quando estes átomos resfriam, voltam ao estado normal não excitado e re-emitem sua energia absorvida por radiação com comprimentos de onda específicos, alguns dos quais na região visível de luz

(Na<sup>+</sup>: 589 nm, Li<sup>+</sup>: 670 nm, K<sup>+</sup>: 768 nm). Um metal alcalino aspirado através de uma chama de baixa temperatura, na forma nebulizada emite, depois de ser isolada por um filtro óptico. A emissão é proporcional ao número de átomos excitados e, portanto, a concentração do íon na amostra.

### *3.5.1 FÓRMULAS PARA CÁLCULO DO CLEARANCE DE Li E CREATININA E DE FRAÇÃO DE EXCREÇÃO Na.*

#### 3.5.1.1 Clearance de Creatinina (C<sub>Cr</sub>)

Representa a depuração plasmática da creatinina por unidade de tempo pela totalidade dos glomérulos renais funcionantes, calculada pela fórmula (UxV/P), sendo U a concentração urinária de creatinina, V o fluxo urinário minuto e P a concentração plasmática de creatinina. Os resultados foram expressos em µl/min/100g peso corporal.

#### 3.5.1.2 Clearance de Lítio (CLi)

Para o calculo do clerance de lítio foi utilizado a fórmula:

$$CLi = ULi \times V \text{ (min)}/PLi$$

#### 3.5.1.3 Fração de Excreção de Sódio (FENa)

Representa a fração de carga filtrada de sódio excretada pela urina num determinado período de tempo, calculada pela fórmula  $(C_{Na}/C_{Cr} \times 100)$ , sendo  $C_{Na}$  o clearance de sódio e o  $C_{Cr}$ , o clearance de creatinina. Os resultados foram expressos em percentagem (%).

#### 3.5.1.4 Fração de Excreção de Potássio (FE<sub>k</sub>)

Representa a fração de carga filtrada de potássio excretada pela urina num determinado período de tempo, calculada pela fórmula  $(C_k/C_{Cr} \times 100)$ , sendo  $C_k$  o clearance de potássio e o  $C_{Cr}$ , o clearance de creatinina. Os resultados foram expressos em percentagem (%).

#### 3.5.1.5 Fração de excreção proximal de sódio (FEPNa)

Representa a fração de carga filtrada de sódio excretada ao longo do túbulo proximal do nefro, calculada pela fórmula  $(CLi/CCr \times 100)$ , sendo  $CLi$  o clearance de lítio e o  $CCr$ , o clearance de creatinina. Os resultados foram expressos em percentagem (%).

#### 3.5.1.6 Fração de excreção pós-proximal de sódio (FEPPNa):

Representa a fração de carga filtrada de sódio excretada ao longo dos segmentos distais do nefro, calculada pela fórmula ( $C_{Na}/C_{Li} \times 100$ ), sendo  $C_{Na}$  o clearance de sódio e o  $C_{Li}$ , o clearance de lítio. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

### 3.6 FRACIONAMENTO ISOTRÓPICO

Para estimar o número de todas as células do tronco encefálico, bem como, especificamente o número de células de neurônios foi empregada a técnica denominada fracionamento isotrópica (HERCULANO-HOUZEL S e LENT R 2005).

Cinco filhotes machos de cada grupo com idades de 12 dias e 16 semanas de vida foram perfundidos com paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7.4. Os troncos encefálicos destes animais foram retirados, pesados e submetidos ao fracionamento em um vidro homogeinizador com 3mL de solução de dissociação (40mM de citrato de sódio e 1% de Triton X-100). Assim que o tecido apresentou-se perfeitamente homogeneizado na solução de dissociação foi transferida com auxílio de pipeta Pasteur para tubos de centrifugação graduados e o volume final ( $v_f$ ) foi precisamente ajustado com

PBS 0,1M para 10ml para os troncos encefálicos de animais de 12 dias e para 25mL para os animais de 16 semanas de vida.

### 3.6.1 ESTIMATIVA DO NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS DO TRONCO ENCEFÁLICO

Para estimar o número total de células (*ntc*) primeiramente homogeneizou-se manualmente a solução 20 vezes por tombamento, imediatamente uma alíquota de 1mL foi retirada e centrifugada por 5' a 6000rpm o sobrenadante foi descartado e o pellet foi suspenso para 1mL com PBS contendo 1% de 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI). A alíquota novamente foi homogeneizada e 10µl desta foi coletada e lançada em uma câmara de Neubauer (vide anexo III), aguardou-se 5' para dar início a contagem.

A contagem dos núcleos (representando as células individuais) marcados com DAPI foi realizada para aqueles núcleos que encontravam-se dentro de 16 quadrantes de um total de 25 que a câmara apresenta em seu quadrado central (vide figura 9), cada um destes 16 quadrantes comporta um volume de 4nL, esta contagem foi realizada quatro vezes para cada amostra, ou seja, primeiramente contou-se o número de núcleos (*nnc*) em um volume conhecido de 256nL (4nL x 16 quadrantes x 4 contagem) .

### 3.6.1.1 CÁLCULO DA ESTIMATIVA DO NÚMERO TOTAL DE NÚCLEOS

O número total de núcleos é dado pela equação:

$$ntc = (ncc \times 1000000) / 256 \times vf$$

onde:

ntn = número total de núcleos,

ncc = número de núcleos contados,

vf = volume final.

### 3.6.2 ESTIMATIVA DO NÚMERO TOTAL DE NÚCLEOS DE NEURÔNIOS

Para estimar o número total de neurônios (ntneu) homogeneizou-se manualmente 20 vezes a solução por tombamento, imediatamente uma alíquota de 1mL foi retirada e centrifugada por 5' a 6000rpm o sobrenadante foi descartado e o pellet foi suspenso para 1mL com PBS. Esta lavagem (processo de centrifugação e re-suspensão do *pellet*) foi realizada 3x.

Findo a ultima lavagem o *pellet* foi suspenso e encubado a temperatura ambiente por 24h com anti-NeuN mouse IgG (1:200 em PBS; Chemicon, Temecula, CA). No dia seguinte a alíquota foi lavada 3x e os núcleos foram encubados com anticorpo secundário, Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG 3



(γ3) (1:200 em 40% PBS, 10 NGS (Normal Goat Serum) e 50% DAPI) por 2h, novamente os núcleos foram lavados e suspensos em 200μl de PBS para contagem dos núcleos de neurônios em microscópio de fluorescência.

Após homogeneização mecânica uma alíquota de 10μl foi lançada na câmara de Neubauer aguardou-se por 5' e então fez-se a leitura, contando-se primeiramente os núcleos marcados com DAPI, pois este reagente marca todos os núcleos indiscriminadamente (endotélio, células da glia, neurônios), em seguida trocou-se o filtro azul do microscópio pelo filtro verde e realizou-se a contagem dos núcleos marcados com Alexa 488 que marca apenas núcleos de neurônios. A contagem do núcleo de neurônio só foi considerada válida para aquelas marcações (DAPI e Alexa 488) que se sobrepunham. Foi contado um mínimo de 500 núcleos marcados com DAPI para determinar o número estimado de número de núcleos de neurônios (nenu), assim estimou-se que: em 500 núcleos marcados com DAPI há “n” núcleos marcados com Alexa 488.

#### 3.6.2.1 CALCULO DA ESTIMATIVA DO NÚMERO TOTAL DE NEURÔNIOS

O número total de núcleos de neurônios é dado pela equação:

$$ntneu = (ntc * neuc) / 500$$

onde:

ntneu = número total de neurônios,

ntn = número total de núcleos,

neuc = número de núcleos de neurônios contados.

### 3.7 COLETA, IMUNOPRECIPITAÇÃO E IMUNOBLOTTING

Cinco filhotes machos de cada grupo com idades de doze dias de vida foram sacrificados por decapitação. Na 16ª semana de vida, mais cinco animais de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical. Os troncos encefálicos foram rapidamente removidos e colocados em tubos Falcon contendo 2 mL de solução tampão de extração (10 mM de EDTA, 100 mM de Trisma base, 10 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de ortovanato de sódio, 2mM de PMSF, 0,1mg/mL de aprotinina). Esta solução foi completada com água deionizada até o volume adequado para homogeneização em um Polytron (modelo PT 10/35, *Brinkmann Instruments*) operando em velocidade máxima por 15 segundos. Terminada a extração, foi aplicada a cada amostra 10 % do volume total de Triton 10% por 40 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4 °C durante 40 minutos a 120 00 RPM e o sobrenadante foi congelado em freezer -80°C para posterior processamento. A quantificação proteica foi realizada com método de Biureto,

com adição de 20 µL do extrato, a 1 mL de Biureto. As amostras foram lidas por espectrofotometria após a adição de 100 µL de Laemmli e para o armazenamento das amostras foi acrescido 0,015 mg de DTT (antifúngico).

O extrato total foi aquecido a 95°C por 5 minutos em banho-maria e alíquotas de 250 µg foram aplicadas em gel (SDS-PAGE), de 2 mm de espessura. No mesmo gel foi aplicada uma amostra padrão de proteínas, ou seja, o marcador de peso molecular com pesos moleculares conhecidos: miosina (205 kDa), beta galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (80 kDa) e ovalbumina (49 kDa). As proteínas apareceram sob coloração azul no gel de eletroforese e na membrana de nitrocelulose, permitindo a orientação quanto ao peso molecular das bandas a serem observadas.

A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da *BioRad* (Mini-Protein), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 40 volts, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento (*stacking*) e 120 volts até o final do gel de resolução (*resolving*). As proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletro-transferência de minigel da *BioRad*, e a solução tampão para transferência mantido em voltagem constante de 120 volts por 2 horas, sob refrigeração contínua com gelo. Posteriormente a transferência das proteínas, acrescenta-se solução bloqueadora (10 ml de solução basal + 0,5 g de leite em pó desnatado Molico®) em agitação constante por 2 horas, seguida de lavagem com solução basal (PBS-T)(3 vezes em agitação durante 10 minutos) e incubação a 4°C overnight com os seguintes anticorpos: anticorpo policlonal para AT1R (sc 1173, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA); anticorpo policlonal para AT2R (C-18, sc 7420, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA), diluídos em solução tampão (10 ml de solução basal + 0,3 g de

leite em pó desnatado Molico<sup>®</sup>). Após incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas 3 vezes com solução basal em agitação por 10 minutos, e incubadas com anticorpo secundário ligado a peroxidase (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) por 2 horas. Por último, as amostras foram lavadas com solução basal por 3 vezes durante 10 minutos. Para a revelação das membranas foi empregado um kit de quimiluminescência Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate da marca Thermo Scientific sendo o filme revelado em solução reveladora e fixadora (revelador manual marca Brafox).

### 3.8 IMUNOISTOQUÍMICA

Os animais (NP, n=5, LP, n=5 e LPT n=5) foram anestesiados com ketamina (75mg/kg) e xilasina (10mg/kg) intraperitoneal e o nível de anestesia controlado pelo monitoramento do reflexo corneal. A perfusão foi realizada com o auxílio de uma bomba de perfusão mantendo-se a pressão média de 120 mmHg, sendo cada animal perfundido 15 minutos com solução salina heparinizada a 5% em temperatura ambiente e 20 minutos com solução de paraformaldeído a 4%.

Após perfusão, os encéfalos foram fixados por imersão em paraformaldeído a 4% por 2 horas. Após a fixação, o material foi desidratado em série etanólica crescente, diafanizado em xilol e incluído em Paraplast. Cortes de 5 µm foram produzidos em micrótomo rotativo (ver esquema em anexos IV, V, VI e VII),

coletados em lâminas silanizadas e armazenados até o momento de uso. Os cortes histológicos, aderidos em lâminas silanizadas, foram desparafinizados e posteriormente submetidos a recuperação antigênica em panela de pressão em tampão citrato, pH 6,0 por 30 min. Após as lâminas esfriarem foram realizadas lavagens em PBS (0,1M, pH 7,4) por 3 vezes (5 minutos cada), posteriormente foi realizado a inibição da peroxidase endógena (90mL de peróxido de hidrogênio com 10mL de etanol) e as lâminas incubadas com solução bloqueadora (Soro fetal bovino 8%, Albumina bovina 2,5% e leite em pó desnatado 2% em PBS). Os cortes foram, então, incubados com os seguintes anticorpos primários AT1 rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz) com diluição de 1:200, AT2 rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz) com diluição de 1:200, diluído em BSA 1% *overnight*, sob refrigeração. Após lavagem com PBS (4 vezes com intervalos de 5 minutos) os cortes foram expostos ao anticorpo secundário específico, conjugado com peroxidase, durante 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagens sucessivas com PBS, a revelação foi feita com DAB, contra-coloração com hematoxilina, desidratação e montagem com lamínula.

A análise das imagens foi realizada em microscópio óptico e a documentação fotográfica foi feita com auxílio de câmera CCD-IRIS (Sony).

### 3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS

A análise estatística dos resultados dos estudos foi realizada utilizando a Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas com Post-hoc pelo teste de

contraste de Bonferroni. Para os resultados do western foi usado o teste de Tukey-Kramer. Os resultados foram expressos como Media  $\pm$  Desvio Padrão da Media (DPM). Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% ( $P < 0,05$ ). O software utilizado em todos os testes estatísticos foi GraphPad Prism 5.0, Copyright 1992-1998 GraphPad Software Inc.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 ACASALAMENTO E LAVADO VAGINAL

Das 20 fêmeas submetidas ao acasalamento, apenas duas fêmeas não apresentaram espermatozoides no lavado vaginal ao longo da semana experimental e portanto, foram excluídos do experimento.

### 4.2 COMPILAÇÃO DOS DADOS REFERENTE AO GANHO DE MASSA CORPORAL DURANTE A GESTAÇÃO

As 18 fêmeas com a prenhez confirmada foram submetidas à aferição do ganho de massa corporal a cada sete dias, durante o período gestacional. A média e desvio padrão dos ganhos de ponderais semanais das fêmeas submetidas à dieta normoprotéica 17%, NP (n=6), hipoprotéica 6%, LP (n=6) e hipoprotéica suplementada com 2,5% de taurina, 6%+Tau, LPT (n=6) estão apresentados no gráfico abaixo (Figura 8):

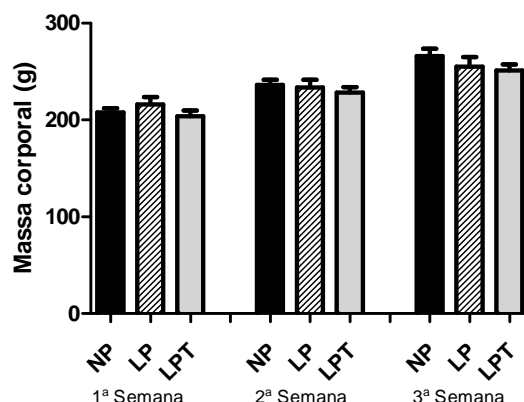


Figura 8 - Ganho ponderal (g) ao longo das 3 semanas de gestação de ratas Wistar Hannover submetidas à dieta normoprotéica (17%), hipoprotéica (6%) e hipoprotéica suplementada com 2,5% de taurina (6%+Tau).

#### 4.3 COMPILAÇÃO DOS DADOS REFERENTE MASSA CORPORAL DOS FILHOTES MACHOS, NASCIDOS DE MÃES SUBMETIDAS À DIETA NORMOPROTÉICA 17%, HIPOPROTÉICA 6% E HIPOPROTÉICA 6% + 2,5% DE TAURINA DURANTE A GESTAÇÃO

A massa corporal dos animais foi aferida nos dias 1, 12 e semanalmente a partir da 6ª semana de vida. As aferições foram compiladas com o uso de uma balança digital semi-analítica (AL 500 Denver Instruments – USA). Com relação a massa corporal da prole de 1 dia de idade (figura 10, observou-se uma diferença significativa  $p < 0.005$  entre os grupos NP x LP e LPT x LP). A média da massa corporal dos animais do grupo NP foi maior ( $6,650 \pm 0,46g$ ) em relação ao grupo LP ( $5,980 \pm 0,58g$ ) e a média do grupo LPT foi maior ( $6,580 \pm 0,32g$ ) em relação ao grupo LP.

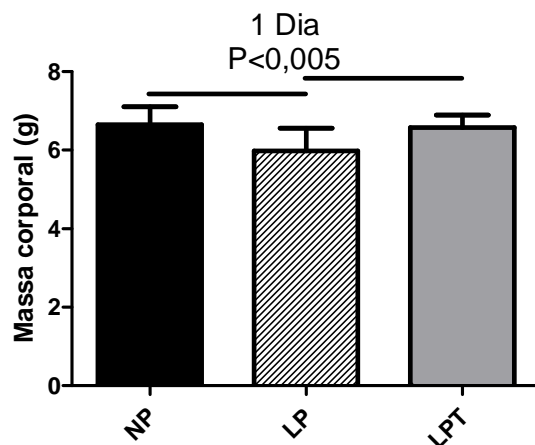


Figura 9 – Massa corporal dos filhotes machos com 1 dia de vida submetidos à dieta com 17%, 6% e 6% de proteína + 2,5% de taurina durante período gestacional, n = 6.

Para os animais do grupo LP com 12 dias de idade, quando comparados aos animais NP e LPT, observou-se um ganho ponderal significativamente maior quando comparados aos resultados de 1 dia vida.

A massa corporal com 12 dias de idade do grupo LP passou a ser mais elevada ( $25,34 \pm 3,13\text{g}$ ) quando comparada com os animais dos grupos NP ( $18,88 \pm 1,29\text{g}$ ) e LPT ( $20,77 \pm 2,55\text{g}$ )  $P < 0.05$ .



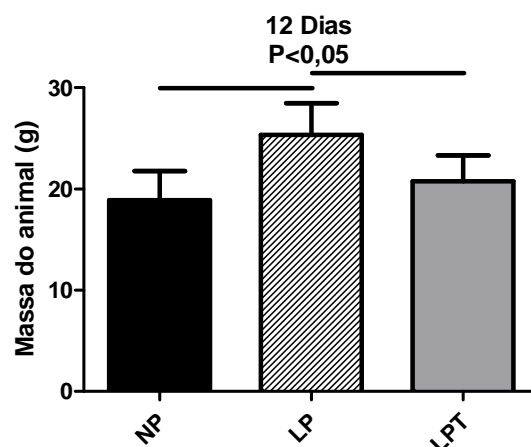


Figura 10 – Massa corporal dos filhotes machos com 12 dias de vida submetidos à dieta com 17%, 6% e 6% de proteína + 2,5% de taurina durante período gestacional, n= 5.

A massa corporal dos animais na idade adulta (16 semanas), não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados,  $P > 0.05$ . O grupo NP apresentou um peso corpóreo de  $343,6 \pm 45,04\text{g}$  o grupo LP  $343,9 \pm 16,39\text{g}$  e o grupo LPT  $362,8 \pm 19,31\text{g}$ .

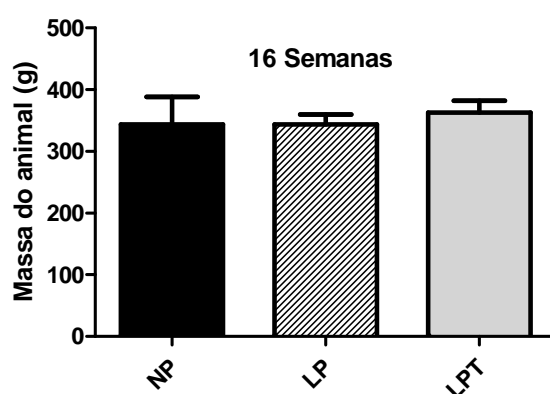


Figura 11 – Massa corporal dos filhotes machos com 16 semanas de vida submetidos à dieta com 17%, 6% e 6% de proteína + 2,5% taurina de durante período gestacional, n= 6.

Ao avaliar semanalmente a massa corpórea entre os grupos de animais na idade adulta, observou-se que não houve diferença significativa,  $P>0.05$ .

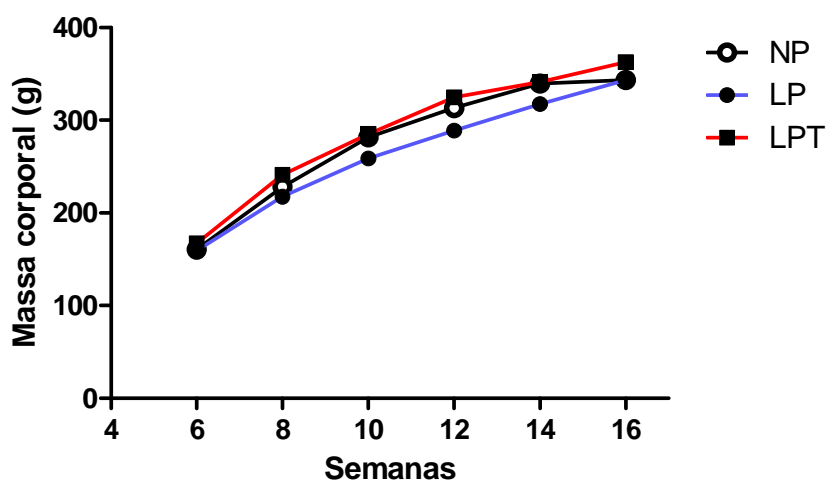


Figura 12– Sintetiza a evolução da massa corporal dos filhotes machos, a partir da 6ª semana de vida, submetidos à dieta com 17%, 6% e 6% de proteína + 2,5% taurina de durante período gestacional,  $n= 6$ .

#### 4.4 PRESSÃO ARTERIAL CAUDAL (PAC)

A pressão arterial sistólica medida por pletismografia de cauda aumentou significativamente no decorrer dos experimentos (da 6ª para a 16ª. semana após o nascimento) no grupo de animais machos filhos de mães tratadas durante a gestação com dieta LP quando comparados aos níveis pressóricos de animais originários de mães tratadas com ração NP.

Da 6ª à 12ª semana de vida os animais cuja as mães receberam dieta LP acrescida com 2,5% de taurina (LPT) apresentaram os valores da pressão sistólica semelhante as obtidas nos animais LP, entretanto a partir da 14ª semana de vida, os registros da pressão sistólica passaram a ser significativamente menores quando comparados ao animais LP.

Assim, a pressão arterial sistólica do grupo LP aumentou de  $116.2 \pm 6.5$  mmHg para  $137.9 \pm 6.9$  mmHg comparada com uma discreta e não significante elevação observada nos animais NP de  $114 \pm 7.4$  mmHg para  $118.8 \pm 8.7$  mmHg, enquanto a pressão arterial do grupo LPT aumentou de  $114 \pm 6.5$  mmHg para  $135 \pm 6.2$  mmHg e então diminuiu para  $124 \pm 3.6$  mmHg.

No grupo LP, a elevação significativa da pressão arterial ocorreu a partir da 12ª. semana de vida e permaneceu assim até a última aferição que ocorreu na 16ª semana. Também para o grupo LPT à partir da 12ª. semana de vida a elevação pressórica passou a ser significativamente maior quando comparada ao grupo NP, porém à partir da 14ª semana passou a ser significativamente menor quando comparada ao grupo LP.

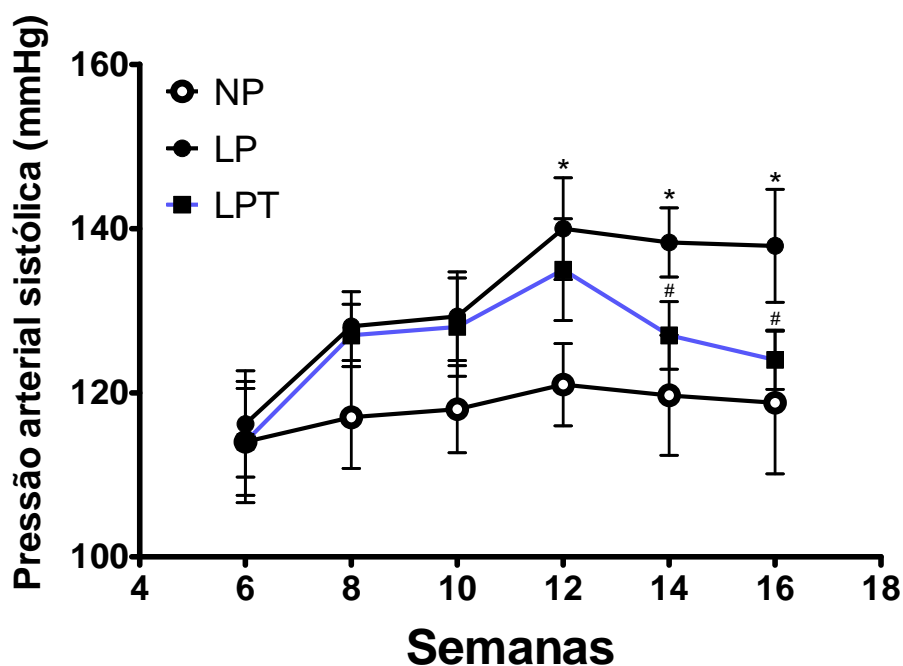


Figura 13 – Evolução da pressão sanguínea sistólica (em mmHg) para os diferentes grupos experimentais, ao longo da semanas de acompanhamento.

#### 4.5 FUNÇÃO RENAL

Os resultados com relação à função renal observados em descendentes machos dos grupos NP, LP e LPT de 8ª e de 16ª semanas de acompanhamento são apresentados como média  $\pm$  DP (n=6 animais por grupo). O fluxo urinário e a taxa de filtração glomerular estimada pelo *clearance* de creatinina, não demonstraram resultados significativamente diferentes durante a avaliação e o estudo da manipulação tubular renal de sódio comparando os diferentes grupos experimentais. A excreção fracional urinária de sódio ( $FE_{Na+}$ ) foi significativamente menor em descendentes de mães submetidas à ingestão de ração com restrição

proteica (6%) e para os animais cuja as mães foram suplementadas com taurina (6% + Taurina) quando comparados à prole de mães submetidas à ingestão normal de proteína (17%). Valores da  $FE_{Na+}$  na 8ª semana de vida, NP  $0,95 \pm 0,078$ ; LP  $0,74 \pm 0,03$ ; LPT  $0,79 \pm 0,02$ . Já a  $FE_{Na+}$  para os animais na 16ª foi significativamente menor apenas para o grupo de animais LP (6%), enquanto para os animais LPT (6% + Taurina) comparados a ratos NP não apresentaram diferença significativa. Valores da  $FE_{Na+}$  na 16ª semana de vida, NP  $1,05 \pm 0,1$ ; LP  $0,72 \pm 0,03$ ; LPT  $0,98 \pm 0,12$ .

A significativa queda na curva de excreção urinária fracional de sódio nos animais com 8 semanas de vida do grupo LP e LPT foi acompanhada por uma também significativa redução na fração de excreção proximal de sódio ( $FEP_{Na+}$ ) quando comparada aos animais NP. Valores da  $FEP_{Na+}$  na 8ª semana de vida, NP  $37,9 \pm 4,8$ ; LP  $26,9 \pm 2,5$ ; LPT  $29 \pm 3,2$ .

Nos animais de 16 semanas a  $FEP_{Na+}$  no grupo LP apresentou-se significativamente menor, enquanto para o grupo LPT não houve diferença em comparação aos animais NP. Valores da  $FEP_{Na+}$  na 16ª semana de vida, NP  $30,7 \pm 6$ ; LP  $18,9 \pm 2,5$ ; LPT  $27,3 \pm 5,2$ .

A fração de excreção pós-proximal de sódio ( $FEPP_{Na+}$ ) apresentou-se significativamente elevada no grupo LP tanto para os animais de 8 semanas quanto para os de 16 semanas de vida, quando comparados aos animais NP e LPT. Valores da  $FEPP_{Na+}$  na 8ª semana de vida, NP  $0,84 \pm 0,11$ ; LP  $1,08 \pm 0,13$ ;

0,98±0,1 e para os animais de 16 semanas de vida, NP 0,73±0,14; LP 1,12±0,15; LPT 0,82±0,16.

Esta queda consistente nas  $FE_{Na^+}$ ,  $FEP_{Na^+}$  associada à elevação na  $FEPP_{Na^+}$ , da 8ª a 16ª. semana de estudo, produzida pela restrição da ingestão proteica durante a gestação, foi seguida por ausência de qualquer alteração na excreção urinária de potássio (figura 32) quando comparados os três grupos experimentais.

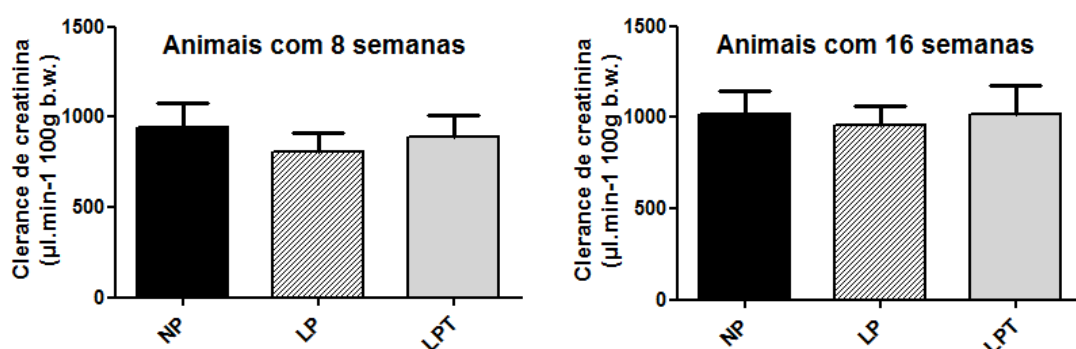


Figura 14 - Estimativa de filtração glomerular pelo *clearance* de creatinina.

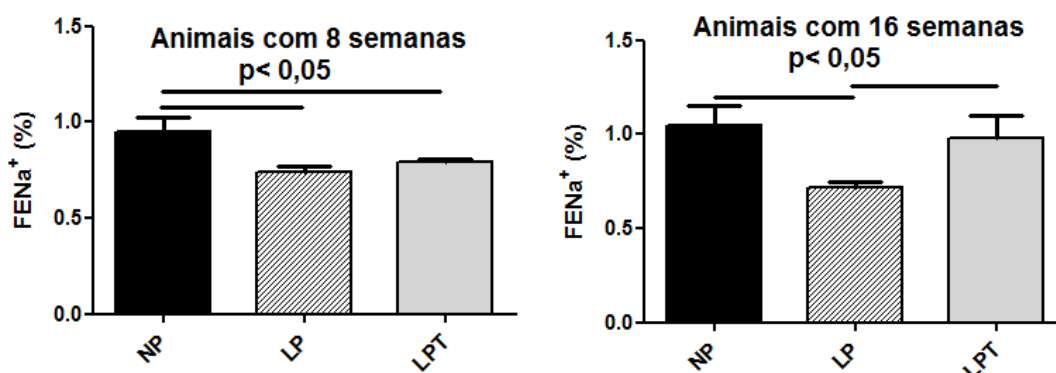


Figura 15 - Excreção fracional urinária de sódio ( $FE_{Na^+}$ )

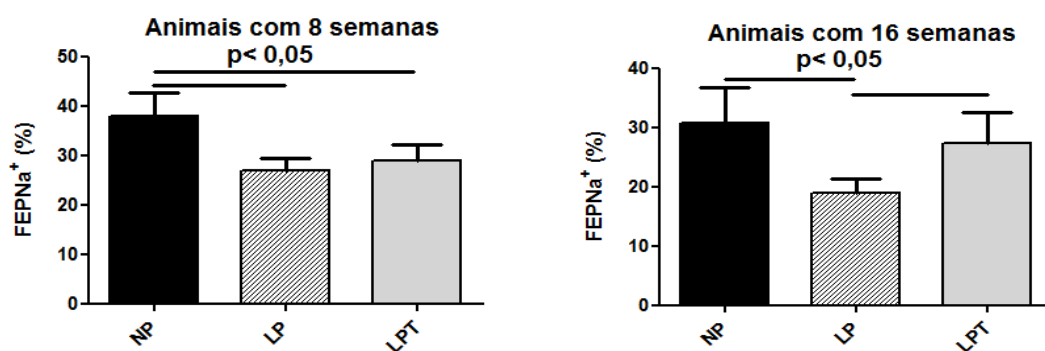


Figura 16 - Fração de excreção proximal de sódio (FEP<sub>Na<sup>+</sup></sub>)

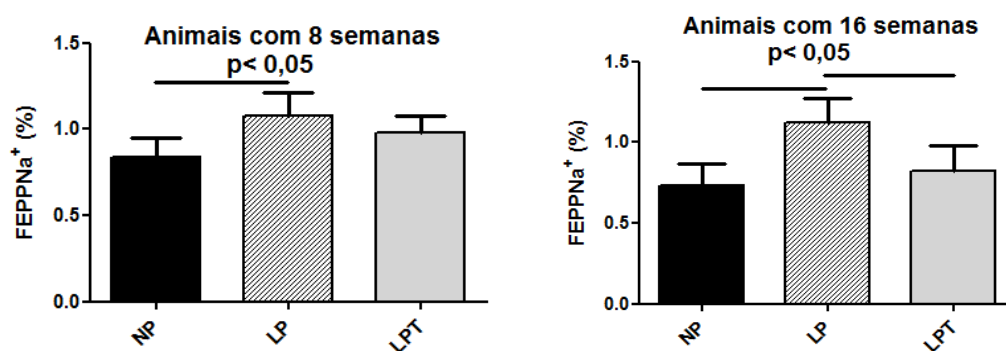


Figura 17 - Fração de excreção pós-proximal de sódio (FEPP<sub>Na<sup>+</sup></sub>)

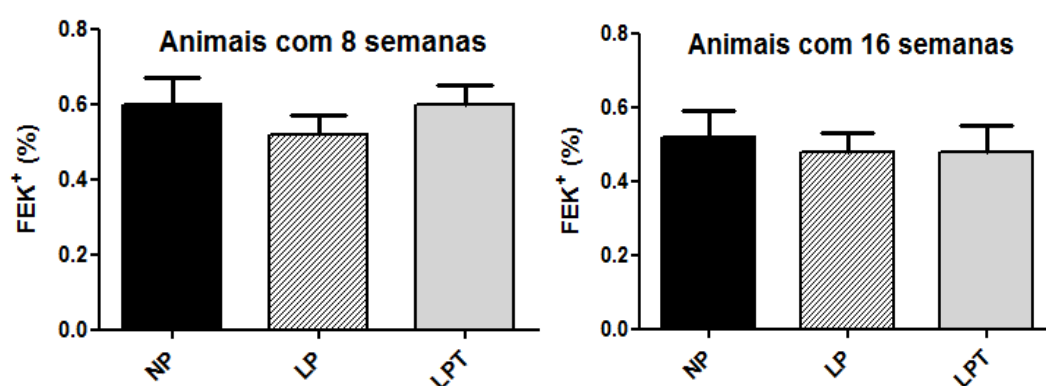


Figura 18 – Fração de excreção de potássio (FEK<sup>+</sup>)

4.6 COMPILAÇÃO DOS DADOS REFERENTE AO FRACIONAMENTO ISOTRÓPICO. LEVANTAMENTO DO NÚMERO DE NÚCLEOS CELULARES DO TRONCO ENCEFÁLICO DE MACHOS, NASCIDOS DE MÃES SUBMETIDAS À DIETA NORMOPROTÉICA 17%, HIPOPROTÉICA 6% E HIPOPROTÉICA 6% + 2,5% DE TAURINA DURANTE A GESTAÇÃO.

#### 4.7 FRACIONAMENTO CELULAR DA MEDULA OBLONGATA

Os resultados com relação ao fracionamento de células do tronco encefálico foram obtidos à partir da contagem dos núcleos celulares da prole resultante de mães submetidas a uma baixa ingestão proteica gestacional (6% de proteína (LP), suplementadas (6% de proteína acrescida de 2,5% de taurina (LPT) e de mães controles alimentadas com ração contendo 17% de proteína (NP).

A quantificação celular foi realizada em animais com 12 dias e 16 semanas de vida. Inicialmente, foi estabelecido o número total de células (neurônios e células da neuroglia) e posteriormente foi definido o número de neurônios da medula oblongata.



#### 4.8 MASSA DO TRONCO ENCEFÁLICO

A massa do tronco encefálico também foi aferida. Assim, os animais LP e LPT com 12 dias de vida apresentaram massa inicial significativamente maior em relação aos animais NP. A massa tronco encefálica dos animais NP foram, respectivamente,  $66,84 \pm 4,50\text{mg}$  a do LP era  $78,10 \pm 3,92\text{mg}$  e a do grupo de animais LPT era de  $83,40 \pm 7,22\text{mg}$ . A massa do tronco encefálico da prole de machos de 16 semanas não apresentou diferença significativa entre nenhum dos grupos estudados.

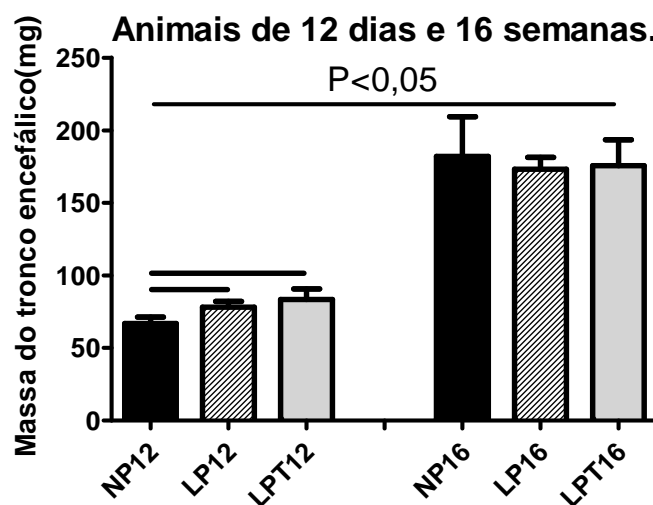


Figura 19 – Massa do tronco encefálico de filhotes de 12 dias e 16 semanas de vida.

No entanto, corrigindo a massa do tronco encefálico, dos filhotes com 12 dias e 16 semanas de vida, por 100 gramas de massa corpórea do animal observamos que, para os animais com 12 dias de vida ocorreram diferenças

significativas entre o grupo LP  $311,1 \pm 31,76\text{mg}$  quando comparado aos grupos NP  $358,9 \pm 41,94\text{mg}$  e LPT  $404,1 \pm 34,13\text{mg}$ .

Os valores entre os animais de 16 semanas entre si não apresentaram diferenças significativas. Por outro lado, a comparação entre os grupos de 12 dias e 16 semanas de idade mostrou expressiva entre as idades estudadas,  $358,0 \pm 46,51\text{mg}$  (média entre grupos 12 dias) contra  $44,47 \pm 2,999\text{mg}$  (média entre grupos 16 semanas).

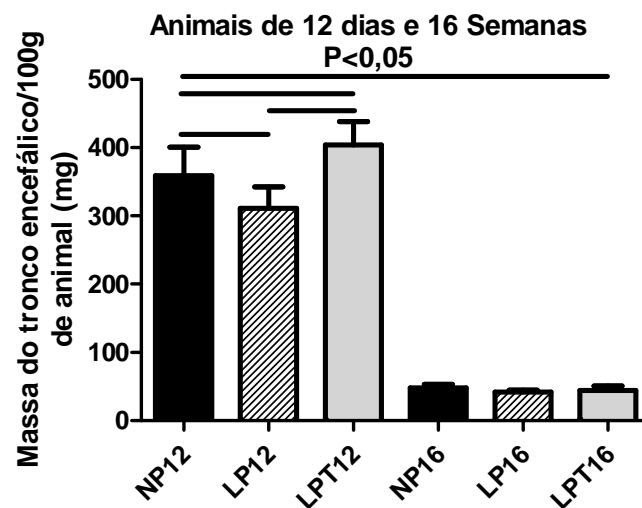


Figura 20 – Massa do tronco encefálico de filhotes de 12 dias e 16 semanas por 100 gamas de massa corpórea.

#### 4.9 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE NÚCLEOS TOTAIS DO TRONCO ENCEFÁLICO

A estimativa do número de células totais do tronco encefálico dos animais

LPT com 12 dias de vida foi significativamente maior em relação aos animais LP e NP sendo o número de células dos animais LP significativamente maior em relação ao NP. Desta forma, o número de células do tronco encefálico dos animais LPT foi  $25,75 \pm 1,28 \times 10^6$ , dos animais LP foi  $23,45 \pm 1,64 \times 10^6$  e para o NP  $20,11 \pm 0,31 \times 10^6$  respectivamente.

A estimativa do número de células totais do tronco encefálico dos animais NP, LP e LPT, com 16 semanas de vida, não apresentaram diferença entre si, mostrando uma média entre o grupo de:  $18,20 \pm 1,69 \times 10^6$  células.

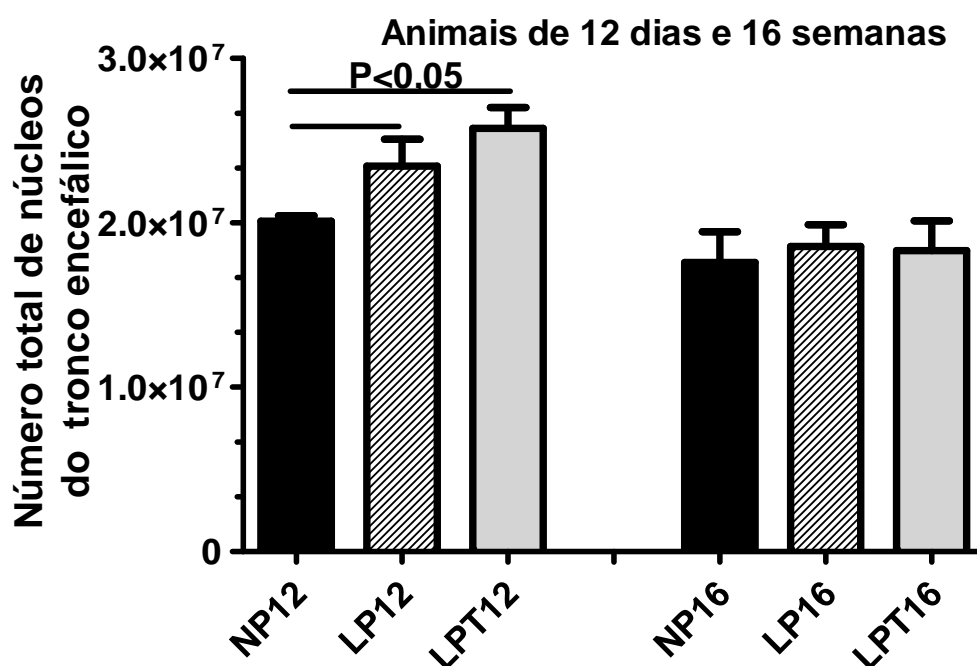


Figura 21 – Estimativa do número de células totais do tronco encefálico de filhotes machos com 12 dias e 16 semanas.

Foi realizada uma normalização do número de células dividindo-os pela massa, em mg, de tronco encefálico.

Os resultados mostram que tanto para os animais de 12 dias como para os animais de 16 semanas, analisados entre si, não houve diferença significativa. Por outro lado, na comparação realizada entre os grupos de diferentes idades a diferença é evidentemente significativa,  $30,42 \pm 2,01 \times 10^4$  (média entre grupos 12 dias) contra  $10,62 \pm 1,20 \times 10^4$  (média entre grupos 16 semanas).

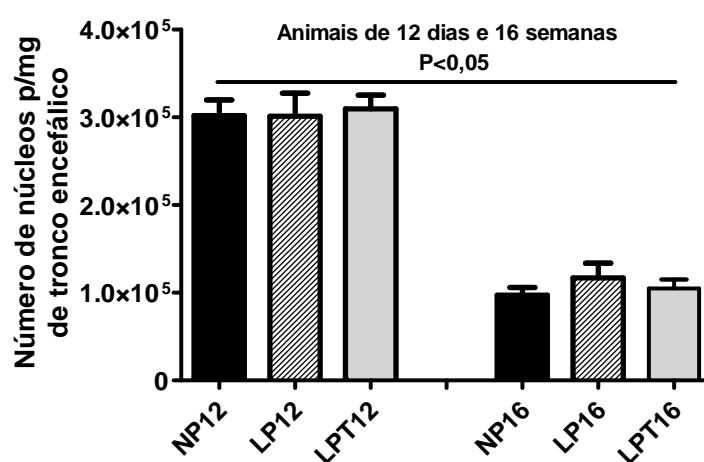


Figura 22 – Estimativa do número de células por miligramas de massa do tronco encefálico de animais de 12 dias e 16 semanas.

#### 4.10 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE NEURÔNIOS DO TRONCO ENCEFÁLICO

A estimativa do número de neurônios do tronco encefálico dos animais LPT, com 12 dias de vida, foi significativamente maior em relação aos animais LP e NP. Não foi observada diferença entre os animais NP e LP. Assim, o número de

neurônios do tronco encefálico dos animais LPT foi de  $43,48 \pm 3,84 \times 10^5$ , a dos animais LP e NP foram respectivamente,  $31,12 \pm 4,06 \times 10^5$  e NP  $33,68 \pm 3,90 \times 10^5$ . O número de neurônios totais do tronco encefálico dos animais NP, LP e LPT com 16 semanas de vida não apresentaram diferença entre si.

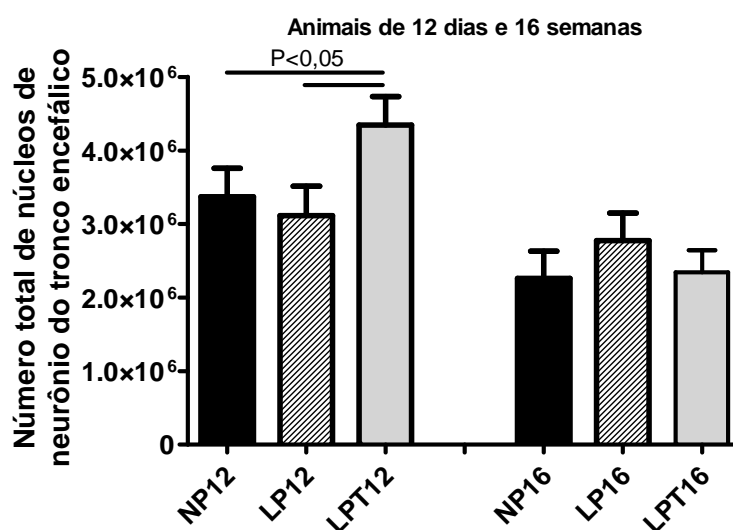


Figura 23 – Estimativa do número de neurônios por miligramas de massa do tronco encefálico de animais de 12 dias e 16 semanas.

Na normalização do número de núcleos de neurônios por mg de tronco encefálico para os animais de 12 dias, o grupo LP apresentou uma redução significativamente menor quando comparado aos animais NP e LPT que apresentaram os seguintes valores: o grupo LP:  $40,00 \pm 5,55 \times 10^3$ , grupo NP:  $50,80 \pm 8,43 \times 10^3$  e para o grupo LPT:  $52,50 \pm 7,03 \times 10^3$  núcleos por mg de tronco encefálico.

Os valores entre os animais de 16 semanas entre si não apresentaram diferença significativa. Agora, quando comparados com os grupos de 12 dias de idade a diferença mais uma vez foi significativa,  $47,70 \pm 7,00 \times 10^3$  (média entre grupos 12 dias) e  $13,90 \pm 1,04 \times 10^3$  (média entre grupos 16 semanas).

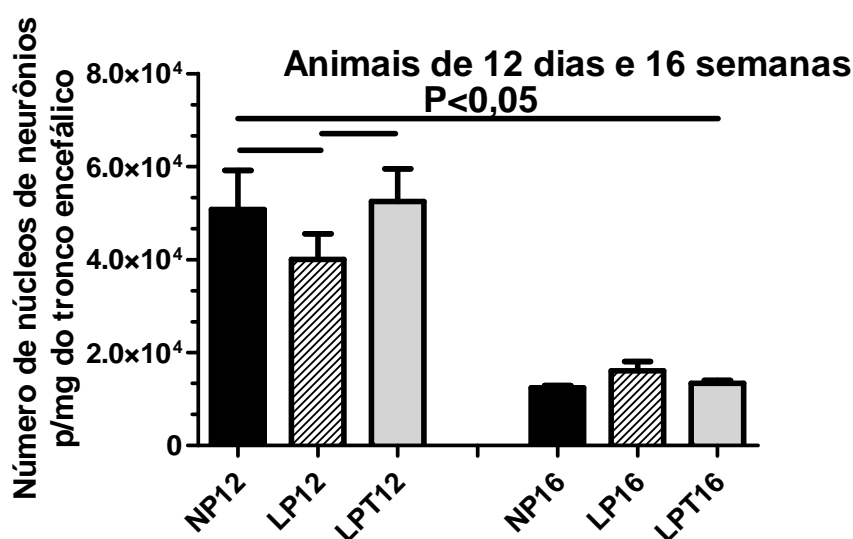


Figura 24 – Estimativa do neurônios por miligrama de massa do tronco encefálico de animais de 12 dias e 16 semanas.

4.11 COMPILAÇÃO DOS DADOS REFERENTE AO WESTERN BLOTTING E A IMUNOISTOQUÍMICA PARA A IDENTIFICAÇÃO DOS RECEPTORES DE AT1 E AT2 NO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO E TRONCO ENCEFÁLICO TOTAL DE ANIMAIS MACHOS COM 16 SEMANAS DE VIDA NASCIDOS DE MÃES SUBMETIDAS À DIETA NORMOPROTÉICA 17%, HIPOPROTÉICA 6% E HIPOPROTÉICA 6% + 2,5% DE TAURINA DURANTE A GESTAÇÃO.

#### 4.12 WESTERN BLOTTING

A expressão dos AT1R, estudada no extrato total de tronco encefálico de ratos LP com 12 dias e 16 semanas de vida, não foi significativamente alterada quando comparado com a observada nos animais dos grupos NP e LPT (figuras 25 e 26). Entretanto, observamos redução de 48 e 39% da expressão deste receptor em LP e LTP, respectivamente, comparativamente ao NP. Esta redução foi mantida até a 16ª semana de vida (cerca de 50%).

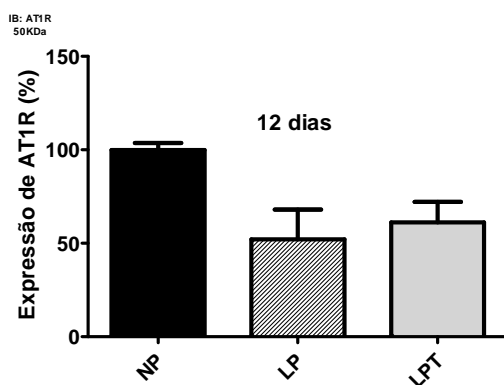


Figura 25 – Expressão dos receptores AT1 em tronco encefálico de animais com 12 dias de vida.

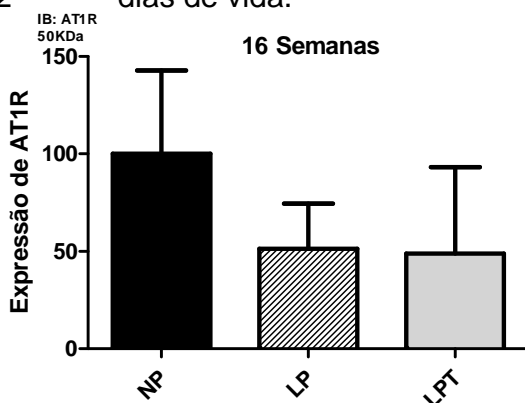


Figura 26– Expressão dos receptores AT1 em tronco encefálico de animais com 16 semanas de vida.

Quanto a expressão de AT2R no tronco encefálico de animais com 12 dias e 16 semanas de vida em descendentes LP também não foi estatisticamente

diferente comparativamente aos animais dos grupos NP e LPT com idades pareadas (figura 27 e 28). Entretanto, observamos redução de 19 e 38% da expressão deste receptor em LP e LTP, respectivamente, comparativamente ao NP. Esta redução foi de 25% em LP e 18% em LTP na 16ª semana de vida.

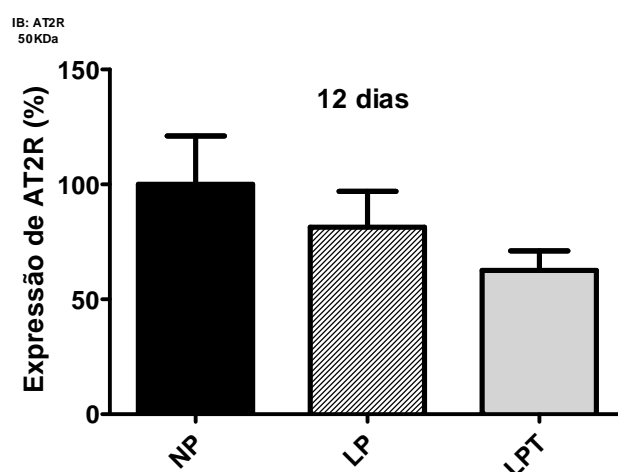


Figura 27 – Expressão dos receptores AT2 em tronco encefálico de animais com 12 dias de vida.

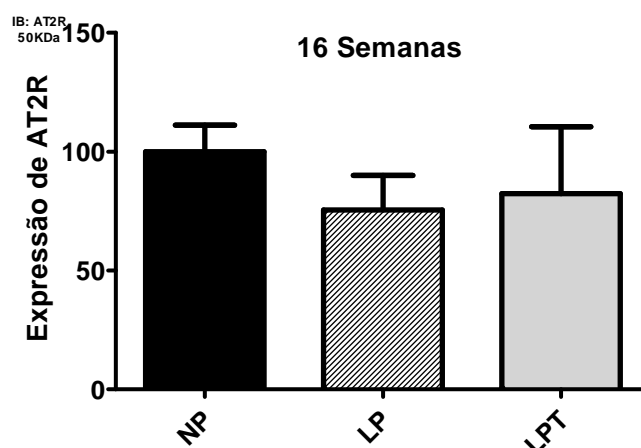


Figura 28 – Expressão dos receptores AT2 em tronco encefálico de animais com 12 dias de vida.



#### 4.13 IMUNOISTOQUÍMICA

Nos animais de 16 semanas do grupo NP observamos, pela técnica de imunistoquímica, a presença do receptor AT1 na parte rostral, medial e caudal (comissural) do núcleo do trato solitário, NTS-R, NTS-M e NTS-C respectivamente (figura 29 A, B, e C). Nos animais do grupo LP observamos marcante redução na expressão deste receptor, principalmente no NTS-M (figura 29 D, E, e F). Já no grupo LTP observamos redução porém não tão intensa como a observada no grupo LP, exceto no NTS-C (figura 29 G,H, I).

Nos animais de 16 semanas do grupo NP também observamos, presença do receptor AT2 na parte rostral, medial e caudal (comissural) do núcleo do trato solitário, NTS-R, NTS-M e NTS-C respectivamente (figura 30 A, B, e C). Nos animais do grupo LP observamos redução na expressão deste receptor, principalmente no NTS-R (figura 30 D, E, e F). Já no grupo LTP observamos redução apenas no NTS-M (figura 30 G,H, I).

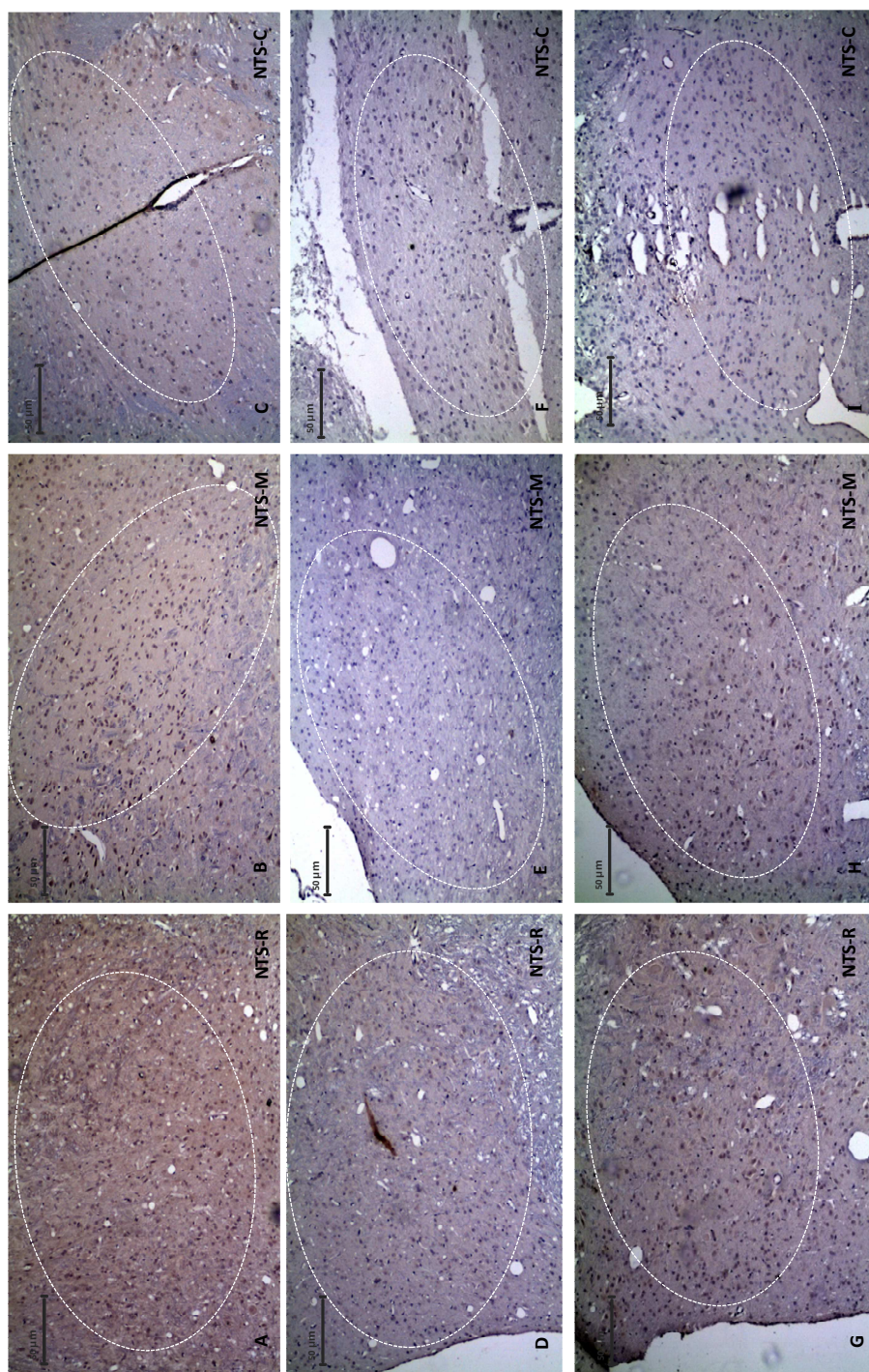


Figura 29 – Imunoistoquímica para localização do receptor AT1 em corte transversal do bulbo do tronco encefálico de animal de 16 semanas. Foram fotografadas as partes rostral, medial e caudal (comissural) do núcleo do trato solitário, NTS-R, NTS-M e NTS-C respectivamente. Grupo NP figuras A, B e C, Grupo LP figuras D, E, e F e grupo LPT figuras G, H e I.



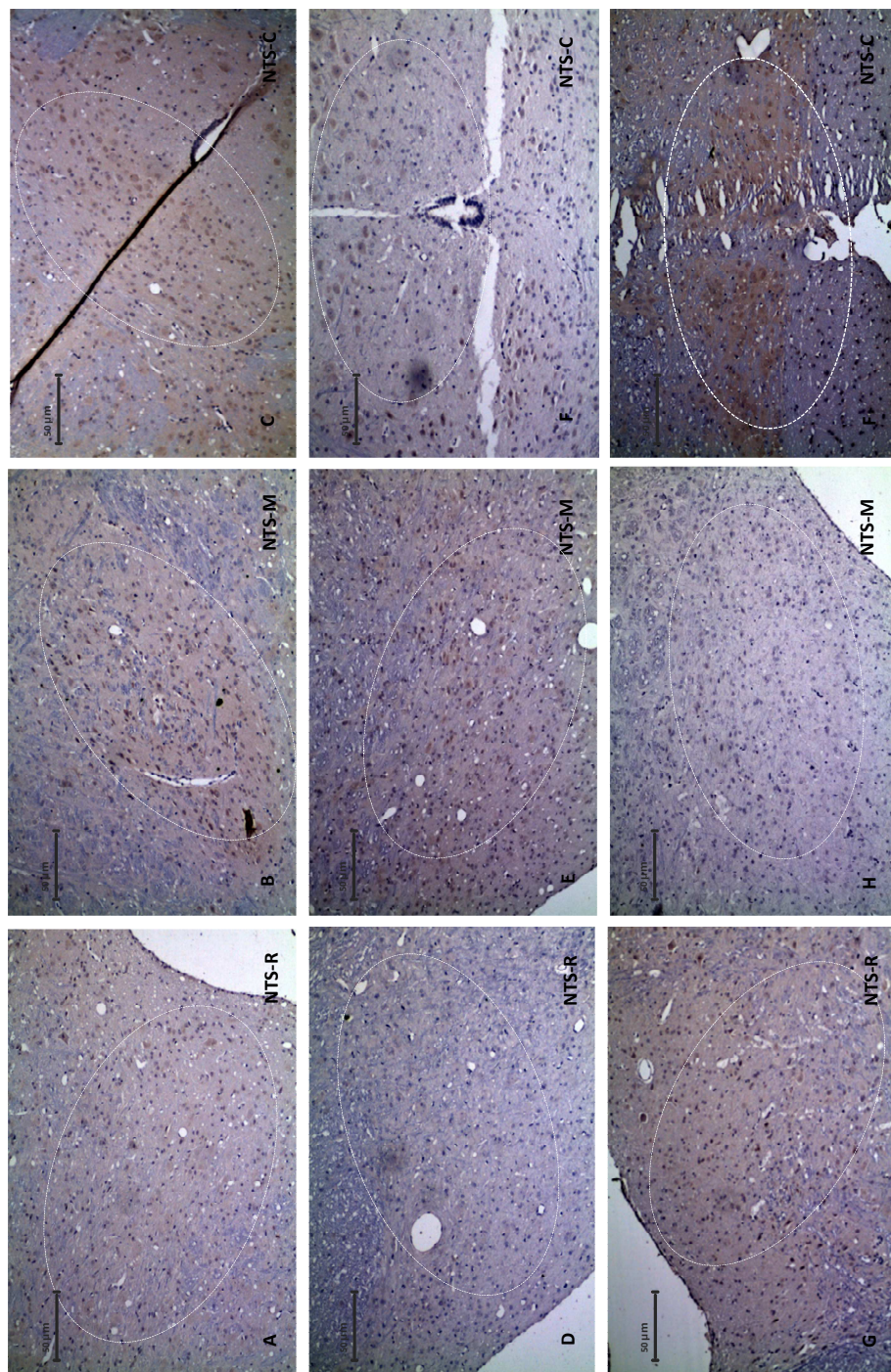


Figura 30 – Imunoistoquímica para localização do receptor AT2 em corte transversal do bulbo do tronco encefálico de animal de 16 semanas. Foram fotografadas as partes rostral, medial e caudal (comissural) do núcleo do trato solitário, NTS-R, NTS-M e NTS-C respectivamente. Grupo NP figuras A, B e C, Grupo LP figuras D, E, e F e grupo LPT figuras G, H e I.



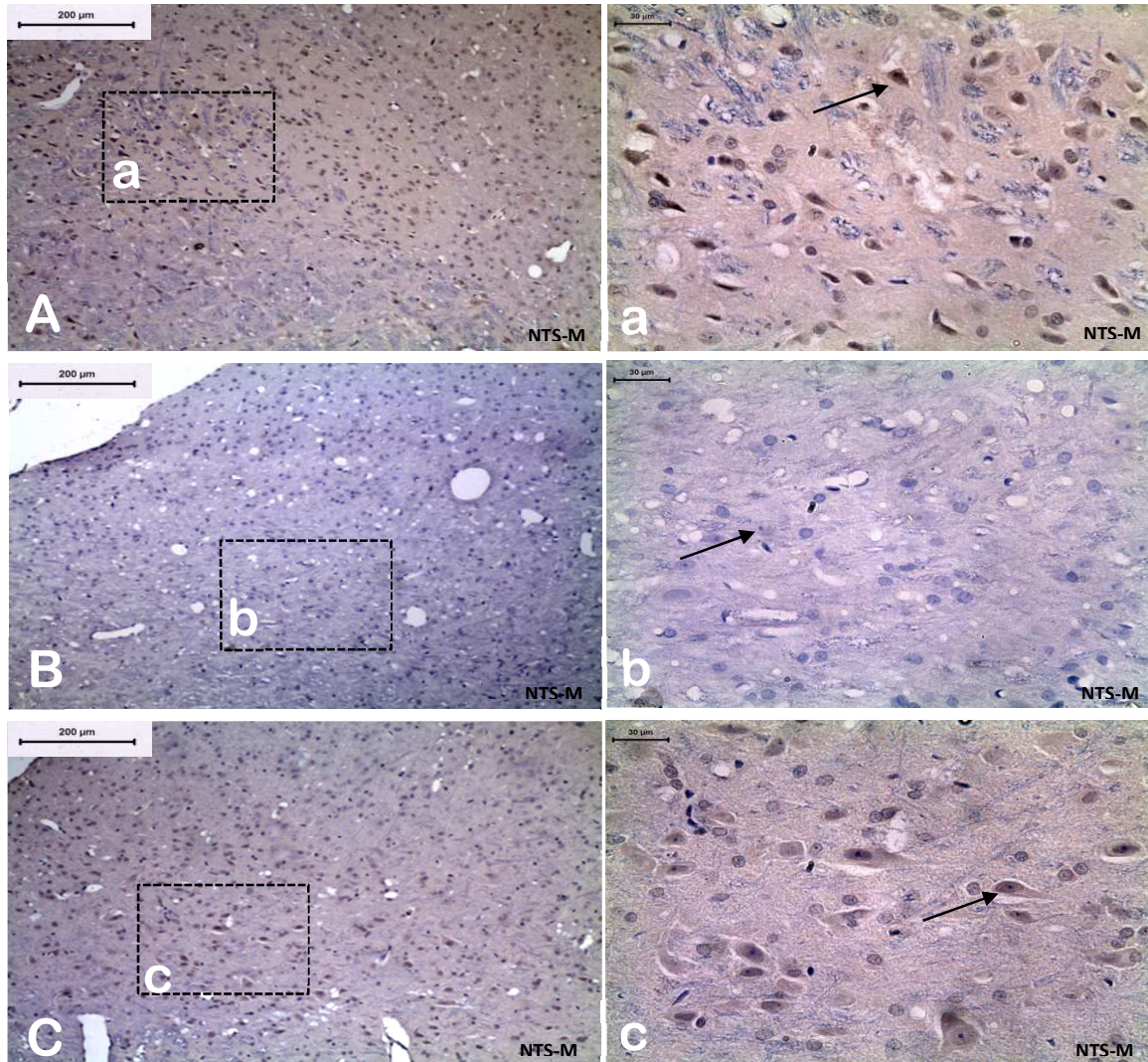


Figura 31 – Imunoistoquímica para localização do receptor AT1 em corte transversal do bulbo do tronco encefálico de animal de 16 semanas. Imagens ampliadas da parte medial do núcleo do trato solitário, NTS-M. Grupo NP figura A, Grupo LP figura B e grupo LPT figura C. As setas apontam para neurônios do NTS.



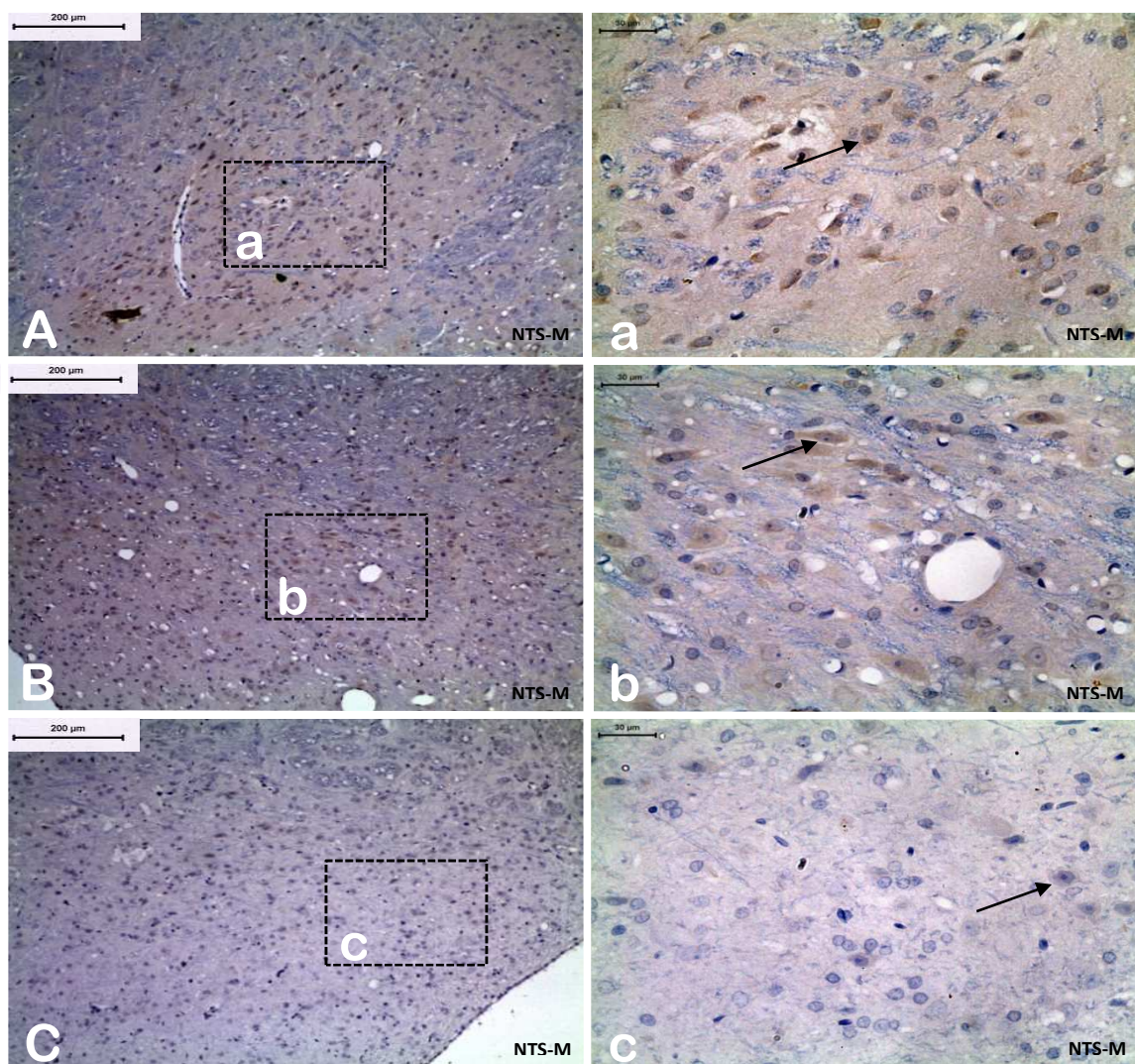


Figura 32 – Imunoistoquímica para localização do receptor AT2 em corte transversal do bulbo do tronco encefálico de animal de 16 semanas. Imagens ampliadas da parte medial do núcleo do trato solitário, NTS-M. Grupo NP figura A, Grupo LP figura B e grupo LPT figura C. As setas apontam para neurônios do NTS.

A tabela a seguir sumariza os resultados obtidos na imunohistoquímica.

	NTS-R		NTS-M		NTS-C	
	AT1	AT2	AT1	AT2	AT1	AT2
<b>NP</b>	***	***	***	***	***	***
<b>LP</b>	*	-	-	**	*	*
<b>LPT</b>	**	***	**	-	*	***

Tabela 1 – Comparação das diferentes intensidades de marcação dos receptores AT1 e AT2 do grupo LP e LPT com o grupo NP, encontrados no núcleo do trato solitário de filhotes machos com 16 semanas de vida. As siglas NTS-R, NTS-M e NTS-C respectivamente correspondem a partes rostral, medial e caudal (comissural) do núcleo do trato solitário. NP grupo controle, LP grupo experimental 1 e LPT grupo experimental 2. \* Intensidade de marcação baixa, \*\* Intensidade de marcação moderada, \*\*\*Intensidade de marcação alta e – sem marcação.

## 5. DISCUSSÃO

Evidências epidemiológicas e estudos realizados em modelos animais vêm demonstrando que fatores externos podem modificar o ambiente uterino levando ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, metabólicas e neuroendócrinas na idade adulta (BARKER et al., 1989;1995; LAW et al., 1991; WILLIAMS et al., 1992; LANGLEY-EVANS, 1998; ASHTON, 2000; EDWARDS et al, 2001; MAO et al., 2009). Este fenômeno é chamado de programação fetal. (HALES e BARKER, 2001; SANDMAN et al. 2011).

Estudos realizados em nosso laboratório submetendo mães a restrição proteica grave durante o período gestacional demonstraram que a prole de machos desenvolve distúrbios na função tubular renal que pode estar relacionado, pelo menos em parte, ao desenvolvimento de hipertensão arterial na idade adulta (Mesquita et al., 2010a). Diante desta observação, implementamos o presente estudo buscando identificar possíveis alterações morfofuncionais do tronco encefálico, especificamente no NTS, área reconhecida por sua função no controle da pressão arterial, vasomotricidade e crono- e inotropismo cardíacos, na prole de mães tratadas durante a gestação com dieta hipoproteica.

Estudos prévios têm demonstrado que o nível de taurina é marcadamente reduzido no plasma de fetos cujas mães foram submetidas a restrição proteica gestacional (BOUJENDAR et al., 2000). Estes estudos foram suportados por outros mostrando que a suplementação de uma dieta pobre em proteína com

taurina restabelece para níveis normais a concentração fetal sérica deste aminoácido (CHERIF et al., 1998).

Tendo em vista estes achados, e uma vez que em nosso laboratório o estudo funcional e morfológico de animais submetidos à restrição proteica gestacional está bem estabelecido, incluímos como objetivo do presente estudo avaliar os efeitos da suplementação dietética com taurina 2.5% sobre a função renal, a expressão de receptores do SRAA e a pressão arterial.

Assim como verificado por outros autores, os resultados deste estudo demonstram que modificações do ambiente intrauterino, pela restrição proteica nutricional (LP), promove uma redução do peso fetal ao nascer quando comparados ao grupo NP (ASHTON, 2000; LANGLEY-EVANS, 1998; EDWARDS et al., 2001; PERSSON e JANSSON, 1992; WOODALL et al., 1996; PRENTICE 1991; GODFREY et al., 1996; Mesquita et al., 2011). Como tem sido observado, os animais LP apresentaram rapidamente (em torno de 7 dias) após o nascimento uma recuperação do peso, fenômeno conhecido como *catch-up growth* (Cianfaranri et al. 1999). Tem sido definido que o baixo peso ao nascer seguido de um rápido crescimento pós-natal estão associados e tem um alto valor preditivo de maior risco de doenças cardiovasculares e metabólicas na idade adulta (ADAIR e COLE 2002; BARKER et al. 2002), tais como por exemplo, a diabetes mellitus tipo 2 e hipertensão arterial (ERIKSSON et al. 2001). Em nosso estudo esta recuperação da massa corporal, *catch-up growth*, foi constatada quando foi realizada a verificação do peso dos animais aos 12 dias de vida, quando se observou que os animais LP apresentavam características ponderais iguais ou



superiores ao grupo NP. Enquanto os animais LP mostraram dados relativos a massa corporal de acordo com o descrito na literatura, interessante, o grupo cuja as mães foram suplementadas com taurina durante a gestação (LPT), não apresentou baixo peso ao nascer e tão pouco o *catch-up growth*. Ou seja, o peso corpóreo dos animais LPT, ao nascer e com 12 dias de vida, não apresentaram diferença significativa quando comparados aos animais NP.

O baixo peso ao nascer é um marcador de deficiência nutricional fetal (LUCAS et al 1999). Evidências experimentais e em humanos indicam que o transporte trans-placentário de aminoácidos da mãe para o feto e o metabolismo fetal dos aminoácidos estão alterados durante a restrição do crescimento intrauterino (RCIU) (BROWN et al. 2011). Ainda, tem sido demonstrado a alta dependência fetal ao transporte placentário de taurina, uma vez que o feto apresenta restrita capacidade de síntese deste aminoácido (AERTS e VAN ASSCHE 2002). Desta forma, aventamos a hipótese que a suplementação da ração hipoproteica com taurina, promoveu uma elevação na concentração deste aminoácido no plasma materno e, subsequentemente, no plasma fetal o que pode ter sido o responsável pela normalização ponderal nos animais LPT.

A insulina é um conhecido fator de crescimento e seus efeitos anabólicos são mediados por ação direta nos tecidos fetais bem como, pelo aumento da secreção hepática do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) EREMIA et al. 2007. Segundo OGATA et al. 1986 demonstraram uma reduzida concentração fetal de insulina em RCIU. Por outro lado, CHERIF et al. 1998, demonstrou a normalização da secreção de insulina em cultura de ilhotas fetais retiradas de

mães LP cuja dieta foi suplementada com taurina. Ainda neste, resultados demonstraram que a adição de taurina à cultura de ilhotas fetais oriundas de mães LP, não foi capaz de restaurar totalmente a secreção de insulina, sugerindo que a suplementação é fundamental durante o período gestacional.

Tendo em conta que a restrição proteica gestacional promove disfunção no crescimento e maturação celular em diferentes tecidos e órgãos (AERTS L, VAN ASSCHE FA 2002; SERGEEVA et al. 2007; WARSKULAT et al 2007) e que em alguns estudos esta alteração está relacionada a deficiência dietética de taurina, avaliamos no presente estudo o número células neurogliais e de neurônios presentes no tronco encefálico de animais com 12 dias e 16 semanas de vida. Nossos resultados mostraram que o número total de células, presentes na medula oblongata, por miligrama de tronco encefálico (mg/Tr) não apresentou diferença entre os três grupos, NP, LP ou LPT, com 12 dias ou 16 semanas, porém quando a mesma comparação foi realizada (mg/Tr) entre os animais de 12 dias e de 16 semanas esta diferença se mostrou expressiva. Entretanto, quando analisado o número de neurônios nos animais de 12 normalizados pela massa ponderal do tronco cerebral (mg/Tr), os animais LP apresentaram uma expressiva redução número neuronal ( $\approx 21\%$ ) quando comparado aos animal NP e LPT. A mesma análise feita para animais de 16 semanas não mostrou diferença significativa entre os grupos, enquanto, a comparação dos animais com 12 dias de idade e de 16 semanas mais uma vez observou-se uma significativa diferença.

Várias condições, como leucomalácia periventricular e restrição do crescimento fetal, foram associadas a distúrbios no desenvolvimento da massa

encefálica branca e cinzenta em recém-nascidos prematuros comparados com crianças saudáveis nascidas a termo (MEWES et. al. 2006). Estas alterações estruturais no encéfalo humano têm sido caracterizadas pela redução global do volume de substância cinzenta em embriões e fetos prematuros (TOLSA et. al. 2004). Trabalhos utilizando ressonância magnética mostraram que o volume hipocampal de crianças com RCIU apresenta-se menor em relação às crianças nascidas a termo (LODYGENSKY et. al. 2008). MEWES et. al. 2006, encontraram uma moderada diminuição no volume de substância branca em RCIU, enquanto PADILLA et. al. 2011 observaram que crianças RCIU apresentam menor quantidade de massa branca nas regiões frontal, temporal, occipital e insular comparadas as crianças nascidas com peso adequado a idade gestacional.

Nossos resultados confirmando aqueles da literatura, mostram que a restrição ao crescimento intrauterino tem impacto negativo sobre o desenvolvimento do encéfalo com reflexo sobre o a densidade numérica de suas células.

Os animais LPT com 12 dias de vida apresentaram o número de neurônios por mg de tronco cerebral semelhante observado em animais NP. A taurina apresenta-se em altas concentrações no cérebro durante o período fetal e neonatal diminuindo desde o nascimento até a idade adulta (STURMAN J.A. 1988). A administração de etanol em ratos jovens desencadeia a apoptose nas células de Purkinje da camada granular interna do cerebelo. A aplicação de taurina demonstrou ter um efeito neuroprotetor sobre a apoptose induzida pelo etanol e, este efeito foi atribuído a vários fatores incluindo a restauração do

conjunto de Bcl-2, regulação do  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular e inibição da atividade da caspase-9 (TARANUKHIN et. al. 2010).

O trabalho de BENNIS-TALEB et al. 1999 mostrou que descendentes de mães LP apresentam uma reduzida vascularização do córtex cerebral, enquanto o trabalho de BOUJENDA et al. 2003 mostrou que a adição de taurina na dieta hipoproteica maternal tem um papel potencial na recuperação da vasculogênese de ilhotas pancreáticas fetais. Embora o trabalho de BOUJENDA tenha apresentado resultados positivos pela adição de taurina sobre os vasos pancreáticos, podemos inferir que este efeito sobre a proliferação e crescimento vascular pode se estender a diferentes leitos capilares nos animais suplementados com taurina, aumentando a perfusão tecidual. Ainda dentro desta hipótese, se considerarmos que este efeito da taurina esteja restrito apenas ao pâncreas ainda assim traria vantagens ao animal suplementado, pois o incremento da secreção de insulina poderia ter um papel determinante no desenvolvimento do animal (DUARTE et. al. 2012; PINHEIRO et al. 2011).

A exposição aguda ou crônica a glicocorticoides sintéticos como a dexametasona causa apoptose das células progenitoras com diminuição do número de neurônios na camada granular externa e interna do cerebelo de camundongos em desenvolvimento (NOGUCHI et al. 2009; MALONEY et al 2011). No modelo experimental utilizado no presente estudo já foi demonstrada uma elevação dos níveis de glicocorticoides que afetam *in utero* o crescimento fetal em roedores (BENEDIKTSSON et al. 1993). Assim, animais filhos de mães submetidas a restrição proteica gestacional estão expostos a níveis mais alto de

glicocorticoides maternos em função da redução placentária de 11 $\beta$ -hidroxisteroide dehidrogenase tipo 2 (11 $\beta$ -HSD-2) que catalisa o cortisol e a corticosterona em cortisona e 11-dehidrocorticosterona, inativos biologicamente (ARAO T. e TAMURA H., 2011). Desta forma, mesmo os animais sem qualquer fator que reduza o crescimento fetal, quando são expostos a dexametasona apresentam significativa redução no número de neurônios cerebelares, permitindo inferir que no presente estudo, animais submetidos a restrição proteica gestacional poderiam estar expostos a elevados níveis de glicocorticoides maternos, o que promoveria uma redução de neurônios do tronco encefálico.

A presente investigação, confirmando estudos prévios (Mesquita et al., 2010), demonstrou que animais LP apresentaram uma significativa elevação da pressão arterial acompanhada por uma expressiva redução na excreção fracional de sódio urinário (FENa<sup>+</sup>) sem que tenha havido uma concomitante alteração da filtração glomerular estimada pelo clearance de creatinina (CCr). A desnutrição gestacional é crítica para a ontogênese renal resultando em redução expressiva do número de nefros (OJEDA et al. 2008, Mesquita et al., 2010). Muitos modelos animais de programação fetal demonstraram uma relação inversa entre o baixo peso ao nascer e o desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica, atribuída, em parte, a esta redução quantitativa do número de nefros (J. MANNING e V.M. VEHASKARI 2001; POLADIA et al. 2006; Mesquita et al., 2011). Estudos com animais RCIU demonstram que o desenvolvimento dos rins apresenta alta sensibilidade às variações do ambiente intrauterino, especialmente, durante as fases iniciais da nefrogênese (LANGLEY-EVANS et al. 1999; VEHASKARI VM,

MANNING J, E AVILES DH 2001). Portanto, a associação entre o reduzido número de glomérulos e a elevação da pressão arterial na vida adulta esta bem estabelecida para a prole submetida a restrição proteica gestacional LANGLEY-EVANS et al. 2003, entretanto, os mecanismos pelos quais isto ocorre são mal entendidos (Mesquita et al., 2010, 2011).

Além disso, a expressão e a atividade dos transportadores de íons tais como  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase (BERTRAM et al. 2001, Mesquita et al., 2011) e a isoforma 3 do trocador sódio-hidrogênio (NHE3) (DAGAN et al. 2007) estão aumentados em animais com RCIU, o que eleva significativamente, a absorção de água e eletrólitos em sítios específicos do nefro.

Nossos resultados para os animais do grupo LP estão alinhados com os descritos na literatura, no entanto, interessante, os animais LPT adultos não manifestaram hipertensão arterial e tão pouco, queda na  $\text{FENa}^+$  comparado ao grupo LP, o que traz mais uma questão para este intrincado mosaico fisiopatológico constituído pela programação fetal.

O aporte maternal de taurina durante a gestação pode ser severamente reduzido em função da ingestão inadequada deste aminoácido e de proteínas (BARKER et al. 2007; FORRESTER 2004; LANGLEY-EVANS 2006; MENDEZ et al. 2004). A diminuição da oferta de taurina perinatal induz danos a múltiplos órgãos em ratos recém-nascidos e adultos, os mecanismos subjacentes a estes efeitos adversos da taurina permanecem ambíguos (AERTS L, VAN ASSCHE FA 2002; SERGEEVA et al. 2007; WARSKULAT et al 2007). A disfunção renal

relacionada a idade, diabetes mellitus e o desenvolvimento de hipertensão arterial são inversamente proporcional aos níveis séricos de taurina (Yamori et al 2010). Assim a suplementação com taurina pode evitar os danos renais relacionados a idade, a hipertensão arterial induzida em DOCA/Sal, por etanol, e a diabetes mellitus tipo 1 induzido por drogas (AERTS L, VAN ASSCHE FA 2002; SERGEEVA et al. 2007; HU et al. 2009; LI et al. 2009; WU et al. 2010). Os efeitos da suplementação dietética com taurina parece estar diretamente relacionada a capacidade deste aminoácido em diminuir a atividade nervosa simpática, provavelmente ao nível do sistema nervoso central (MIZUSHIMA et al, 1996; SATO et al, 1987). Foi mostrado que injeção intracerebroventricular de taurina diminui o fluxo simpático nos animais (INOUE et al. 1985), no entanto, este efeito não parece ser uma ação direta da taurina, mas sim desencadeando outro mecanismo, por exemplo, ação sobre receptores de adenosina ou glutamato (ALBRECHT e SCHOUSBOE 2005; KOHLENBACH e SCHLICKER 1990). Evidências mostram que a taurina age localmente sobre o sistema renina angiotensina encefálico diminuindo a pressão arterial. Sabe-se que a angiotensina II é capaz de ativar os neurônios vasomotores da RVLM aumentando a pressão arterial via sinalização simpática e a aplicação iontoforética de taurina resultou na inibição destes neurônios cardiovasculares (SINGEWALD et al. 1997; ZHU et al. 1998).

Assim, o presente estudo sugere que a suplementação de aminoácidos de taurina a dieta LP oferecida às mães dos animais (LPT), pode ter contribuído para que os fatores pressóricos envolvidos tenham sido atenuados, e a resposta

pressórica, a partir da suplementação ocorresse de forma semelhante aos animais NP.

O controle hemodinâmico renal associado à homeostase cardiovascular é determinado por mecanismos neuro-humorais, dentre os quais estão o sistema nervoso autônomo e o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). O receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1R) medeia a maiorias das funções biológicas clássicas da angiotensina II (AngII) desempenhando uma função crítica no controle da atividade simpática nervosa, da regulação da pressão arterial, do balanço hidro-eletrólito, sede e secreção de hormônio e, sobre a função renal (de GASPARO et al. 2000). Foi observado que o NTS tem importante função no processamento da interação entre barorreflexo, o reflexo parassimpático aferente e vias simpáticas eferentes cardíacas e vasculares todas moduladas por mecanismos dependentes de AT1R. (WANG et al 2007; WANG et al 2008).

Por outro lado, o receptor de angiotensina tipo 2 (AT2R) por algum tempo, teve atribuição para de funções que envolvem a plasticidade neural, o neurodesenvolvimento e crescimento, devido a sua disseminada e elevada expressão nos estágios iniciais do embrião, seguida por uma rápida regressão ou desaparecimento após o nascimento (DE GASPARO et al. 2000; KASCHINA et al. 2003; CAREY et al. 2005). Recente estudo verificando a expressão de AT2R no tronco encefálico, rim e fígado de ratos adultos mostrou maior quantidade deste receptor quando comparados aos embriões e aos ratos recém-nascidos (YU et al. 2011). À análise por *western blot*, observou-se que a expressão de AT1R estava aumentada na medula ventrolateral rostral (RVLM) de ratos com insuficiência



cardíaca crônica enquanto que a expressão de AT2R foi expressivamente reduzida (GAO et al. 2008).

No presente estudo, nós mostramos por meio da imunohistoquímica que a expressão de AT1R e AT2R no núcleo do trato solitário estavam diminuídas nos animais do grupo LP em relação aos NP, ao passo que para os animais LPT a expressão mostra-se semelhante ao grupo NP. Esta diminuição da expressão dos receptores AT1 e AT2 observada no NTS dos animais LP pode ser uma dos fatores envolvidos na elevação pressórica destes animais.

O NTS juntamente com a área ventrolateral do bulbo e o hipotálamo são considerados como locais de controle central dos reflexos barorreceptores e quimiorreceptores e na regulação dos eferentes simpáticos cardiovasculares e consequentemente da pressão arterial. Alterações destas áreas apresentam um potencial fisiopatológico para o desenvolvimento de varias formas da hipertensão neurogênica (GUYENET. P. G. 2006). Estudos tem evidenciado uma capacidade inibitória central da AngII através de seus receptores AT1 capazes de modular, negativamente, a atividade neural simpática. Possivelmente a menor expressão dos receptores de angiotensina II observada nos animais LP contribua para uma menor capacidade inibitória simpática do NTS, promovendo a elevação da pressão arterial nestes animais. YU et al. 2011 apontou que o desequilíbrio entre a expressão de AT1R e AT2R na RVLM contribui para a simpato-excitação na insuficiência cardíaca crônica.

A menor capacidade de controle da atividade simpática sugerida acima pode ter relação com a menor expressão dos receptores AT1 e AT2 e o menor número de neurônios encontrado no tronco encefálico nos animais LP com 12 dias vida. Poder-se-ia questionar quais os motivos ou fatores que levaram aos animais LP com 16 semanas não apresentarem diferenças significativas no número de neurônios do tronco encefálico quando comparado com os animais NP e LPT.

Em humanos o crescimento axonal e dendrítico têm início durante o segundo trimestre, com produção de neurotransmissores e sinaptogênese altamente ativa. Os sulcos e giros cerebrais começam a dobrar durante o terceiro trimestre, continuando no pós-natal (GILBERT, 2003). Depois disso, o excesso de conexões sinápticas serão eliminadas por meio da apoptose programada (HUTTENLOCHER e DABHOLKAR, 1997).

Embora o presente estudo não tenha feito tal análise, poderíamos supor que durante o crescimento dos animais, o processo de maturação do sistema nervoso nos diferentes grupos, não tenha ocorrido de forma semelhante, seja porque os neurônios do tronco encefálico dos animais LP tenham estabelecido menos sinapses em relação aos animais NP e LPT ou, como foi observado nesta região houve uma menor expressão de AT1R e AT2R nos animais LP quando comparados aos NP e LPT.

Reforçando a ideia de que um número menor de neurônios pode levar a uma capacidade menor de controle dos níveis pressóricos, os trabalhos utilizando ressonância magnética mostram que crianças que passaram pela RCIU

apresentam menor volume da massa cinzenta a branca (MEWES et. al. 2006; PADILLA et. al. 2011), e que crianças com RCIU apresentam menor capacidade cognitiva (MORSING et. al. 2011; EICHENWALD et. al. 2008). TOLSA et al. 2004 mostrou que há uma íntima correlação entre a os parâmetros estruturais (menor volume de massa encefálica) e funcionais (menor capacidade cognitiva) do encéfalo.

O NTS é a grande central inicial de processamento de toda informação que chega ao encéfalo a respeito de pressão arterial, frequência cardíaca, enchimento venoso, atividade cardíaca, estado da árvore pulmonar, e composição eletroquímica do sangue. A partir dele, a informação processada é analisada direcionada-se a outras regiões do encéfalo, em particular nas áreas ventrolaterais do bulbo e no hipotálamo (CAMPOS Jr. R, COLOMBARI E, CRAVO S, LOPES OU et al. 2001). Experimentos eletrofisiológicos sugerem que, a longo prazo a pressão arterial é regulada pelo sistema nervoso. A área ventrolateral caudal (CVLM) é uma região vasodepressora que conecta o NTS a uma área simpato-excitatória da RVLM. A RVLM é conhecida por ter uma função essencial no controle tônico e reflexo do tônus vasomotor simpático (DAMPNEY RAL, 1994; SVED AF, ITO S, MADDEN CJ. 2000; PILOWSKY PM E GOODCHILD AK., 2002). O núcleo do trato solitário funciona como um relê (modulando os erros de sinal) entre as projeções sensoriais aferentes que recebe das estruturas neurais rostrais (ENR) e periféricas e, os sinais de retroalimentação oriundos dos receptores cardiovasculares (ZANUTTO et al. 2010). Portanto, parece razoável supor que a menor densidade neuronal do tronco encefálico leve a uma menor capacidade de

controle do tônus simpático pelo NTS levando os animais do grupo LP a desencadearem a hipertensão arterial.

Por meio de imunomarcação foi observada uma alta concentração de receptores de AT1 nas áreas dorso medial e ventrolateral da medula oblonga (ALLEN et al. 1998; AVERILL DB e DIZ D., 2000; HEAD GA, SAIGUSA T, e MAYOROV DN., 2002; HU L, ZHU D, YU Z, e WANG JQ., 2002). A angiotensina II apresentam uma gama considerável de ações sobre os núcleos nervosos do tronco encefálico, assim a densidade neuronal normal observada no grupo LPT em relação aos animais NP e a variável expressão dos AT1R e AT2R no NTS dos animais LPT em relação ao controle pode ter sido um dos fatores mais relevantes para a redução da pressão arterial e uma maior natriurese observada nos descendentes de mães LPT. Esta inferência é baseada no fato de que a AngII induz a facilitação do barorreflexo no RVLM e inibição do barorreflexo no CVLM (SAIGUSA T, IRIKI M, e ARITA J., 1996; SAIGUSA et al. 2003).

A suplementação com taurina reduz a pressão arterial em diferentes modelos experimentais, como foi demonstrado que a suplementação de taurina 3% em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) provoca queda da pressão arterial atribuída a atenuação da atividade simpática (HORIE et. al 1987; TRACHTMAN et al 1989). Outro estudo com SHR mostrou que o tratamento com taurina modula a atividade do SRAA encefálico, inibindo o desenvolvimento da hipertensão induzida por renina ou angiotensina II injetada dentro da área pré-optica (OKAMOTO et. al. 1996). Em ratos sensíveis ao sal (Dahl-S) a administração de taurina 3%, inibiu o aumento da pressão arterial, associada elevação do volume urinário e da

excreção de calicreínas nestes ratos (IDEISHI et. al 1994). Foi reportado também que em ratos com hipertensão renovascular (RHR), no qual os mecanismos associados a angiotensina tem papel de destaque, a suplementação com taurina induziu a hipotensão. Estes efeitos foram potencializados quando a taurina foi associada ao enalapril, normalizando a mobilização de cálcio e revertendo a hipertrofia ventricular (JI et. al 1995). Assim a taurina também esta envolvida na redução da pressão arterial associada a distúrbios do SRAA. Nestes modelos animais citados acima, podemos observar que a taurina realmente tem uma ação sobre os mecanismos da hipertensão, atenuando-a ou mesmo evitando que ela se desenvolva, mas em todos estes animais a taurina foi fornecida em períodos pós-natal. No presente estudo, a suplementação ocorreu durante o período gestacional das mães dos animais, assim a grande questão é: Como a taurina atenuou a elevação da pressão arterial da prole destes animais suplementados?

Nossa hipótese é que ração hipoprotéica gestacional suplementada com taurina evitou ou atenuou a programação fetal.

São múltiplos os mecanismos biológicos e moleculares envolvidos na programação fetal os quais não são totalmente entendidos, têm-se associado a programação fetal o baixo peso ao nascer, exposição a excesso de glicocorticoides, deficiência uteroplacentária e fatores epigenéticos (JONES et al. 2012).

A taurina é um beta aminoácido que contém enxofre com papel essencial durante a vida perinatal, em função da limitada biossíntese fetal (AERTS e VAN

ASSCHE 2002), e na vida adulta (STURMAN 1993), incluindo neste caso funções sobre a regulação do volume intracelular, estabilização da membrana celular, neuromodulação, ação antioxidativa e vasodilatadora, desempenho cardíaco, crescimento e diferenciação renal. A literatura revela que a taurina na fase pré-natal exerce efeitos sobre a neoformação e a expansão da vasculatura quando ofertada tanto para ratas hipertensas quanto para ratas saudáveis. A suplementação oral com taurina em ratas SHRSP durante a amamentação, um variante do SHR, antes ou durante a gestação tem se mostrado responsável pela redução do desenvolvimento da hipertensão na prole destas ratas (HORIE et. al. 1987; KULTHINEE et. al. 2010).

A disfunção endotelial em indivíduos com baixo peso ao nascer é um dos mecanismos que pode explicar o desenvolvimento da hipertensão na vida adulta (GOODFELLOW et. al 1998). A perturbação da função endotelial pode ser devido a uma angiogênese anormal durante o desenvolvimento fetal decorrente de redução na produção ou ação do óxido nítrico (GOODFELLOW et. al 1998; LEESON et. al. 2001). O tratamento com taurina 2% evita o desenvolvimento da hipertensão em ratos que apresentam hipertensão induzida por frutose (FHR). É sugerido que suplementação dietética de taurina evitou o desenvolvimento de hipertensão arterial por sua ação antioxidante e pela manutenção dos níveis de óxido nítrico (NO) (RAHMAN et. al. 2011). O estresse oxidativo ocorre quando a taxa de produção de radicais livres excede a taxa de remoção (ou tamponamento) dos mecanismos celulares de defesa (BURTON e JAUNIAUX, 2010). Tem-se associado o estresse oxidativo ao trabalho de parto pré-maturo, pré-eclâmpsia e a

RCIU (BUHIMSCHI et. al. 2003; O'DONOVAN e FERNANDES 2004; JOSHI et. al. 2008). Durante o desenvolvimento da placenta a mãe e o feto necessitam de um aumento de fluxo sanguíneo para um maior aporte nutricional, a medida que a gestação progride. Desta forma, danos nas células endoteliais dos vasos são particularmente sérios (KNUPPEL et. al. 2012). Uma das substâncias vasodilatadoras mais importantes libertadas pelo endotélio é o NO, que provoca o relaxamento da musculatura lisa dos vasos sanguíneos desencadeando a vasodilatação (Endemann e Schiffrin 2004). Assim esta vasodilatação aumenta fluxo sanguíneo necessário para o crescimento do útero e feto (KNUPPEL et. al. 2012).

Por outro lado, o excesso de radicais livres no sangue pode prejudicar o processo de sinalização desta vasodilatação e, assim, a vasoconstrição ocorre levando a uma diminuição do fluxo sanguíneo para o útero e placenta resultando na maioria das vezes em pré-eclâmpsia ou RCIU (STEIN et. al. 2008). Estudos tem mostrado que a taurina apresenta um papel terapêutico preventivo relevante através de suas propriedades antioxidantes as quais estão principalmente relacionadas à função mitocondrial entre outras estruturas celulares e tissulares (WINIARSKA et al. 2009; SCHAFFER et al. 2010; SUZUKI et al. 2002). Estudo *in vitro* mostrou que a taurina em concentrações fisiológica pode atuar como um eficiente antioxidante contra muitas agressões celulares incluindo os danos oxidativos (OLIVEIRA et. al. 2010).

BOUJENDA et. al 2002, sugere que o IGF-II pode contribuir diretamente para a normalização da proliferação e do balanço apoptótico em ilhotas pancreáticas

fetais de animais LP induzido pela suplementação de taurina. Em outro trabalho BOUJENDA et. al. 2003 mostrou que a adição de taurina na dieta hipoprotéica maternal tem um papel potencial na vasculogênese da ilhota pancreática feta efeito atribuído ao reestabelecimento da expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e seu variante VEGF-R2 uma vez que os autores associaram a menor vascularização das ilhotas fetais a menor expressão destes fatores de crescimento em RCIU. Um outro trabalho onde foi examinado se a expressão gênica de ilhotas fetais seriam afetadas tanto pela dieta hipoprotéica bem como, se a suplementação de taurina poderia prevenir estas alterações, foi encontrado mais de 10% de mudanças em genes de animais LP sendo que a suplementação com taurina normalizou a expressão de todos estes genes. Neste trabalho, os autores mostraram que importantes fatores de transcrição envolvidos com o desenvolvimento do pâncreas e células beta foram afetados pela dieta hipoprotéica maternal, mas, não conseguiram dar uma explicação para a ação preventiva da taurina (REUSENS et. al 2008).

Como referido anteriormente, a restrição proteica gestacional pode resultar em baixo peso ao nascer e posteriormente resistência a insulina, diabetes mellitus e hipertensão arterial na vida adulta (BARKER et al. 2007; ERIKSSON et al. 2007). Dentre os possíveis mecanismos subjacentes a estas alterações incluem o SRAA, o desequilíbrio de glicocorticoides circulantes, o estresse oxidativo e a nefrogênese. A associação entre o número de glomérulos e a pressão arterial está bem estabelecida para a prole submetida a restrição proteica gestacional (LANGLEY-EVANS et, al. 2003). A suplementação com taurina pode direta ou



indiretamente inibir todos estes fatores (AERTS e VAN ASSCHE 2002; RACASAN et al. 2004).

Embora algumas das funções biológicas de taurina sejam bem conhecidas a longo prazo, ainda não é possível explicar em detalhes seus princípios moleculares de funcionamento e o papel preciso deste aminoácido na fisiologia dos mamíferos. Sabemos que muitos estados e processos patológicos estão acompanhados a uma diminuição na concentração taurina nos tecidos. Numerosos estudos demonstraram que a suplementação com taurina inverte ou pelo menos atenua as mudanças associadas ao curso da doença.

#### Considerações finais

O conceito de programação fetal foi expandido: *“Predictive Adaptive Response Hypothesis”* (GLUCKMAN e HANSON 2006). Foi proposto que o feto interage dinamicamente com o meio, adaptando-se de forma a adquirir vantagem de sobrevivência no futuro, pois parece ter a capacidade de prever o ambiente no qual crescerá, utilizando sinais hormonais maternos. Se esta previsão for correta, as adaptações serão apropriadas e vantajosas, caso contrário, há um risco preditivo aumentado de desenvolvimento de doenças, que se manifestarão na vida pós-natal, preferencialmente na vida adulta. Assim, o risco do desenvolvimento de doenças dependerá do grau de concordância ou contraste (*match vs. mismatch*) entre o ambiente previsto pelo feto durante o período de alta plasticidade e o ambiente real no qual crescerá.

## 6. CONCLUSÃO

Assim, podemos concluir que, sob condições de restrição de proteínas, o feto responde, no curto prazo, adaptando-se para acomodar a perturbações no fornecimento de substrato intrauterina. Os animais que sofreram restrição proteica gestacional apresentaram baixo peso ao nascer seguido de *catch-up growth*. Após o nascimento, sob a ingestão normal de proteína da dieta, o resultado a longo prazo dessas adaptações é representado como uma reduzida capacidade de excreção absoluta e relativa urinaria de sódio, associado a aumento da pressão arterial. O presente estudo demonstrou que número de neurônios do tronco encefálico é menor nos animais com 12 dias de vida submetidos a restrição proteica gestacional quando comparado ao grupo controle. Tomando em conta todos estes resultados obtidos até o momento podemos sugerir que a dieta gestacional hipoprotéica suplementada com 2,5% de taurina evitou ou atenuou a programação fetal.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abebe W, Mozaffari MS. Role of taurine in the vasculature: an overview of experimental and human studies. *American journal of cardiovascular disease*. 2011; 1(3):293-311.

Adair LS, Cole TJ (2002). Rapid child growth raises blood pressure in adolescent boys who were thin at birth. *Hypertension* 41:451-456.

Aerts L, Van Assche FA. Taurine and taurine-deficiency in the perinatal period. *J Perinat Med*. 2002; 30:281–6.

Albrecht J, Schousboe A. Taurine interaction with neurotransmitter receptors in the CNS: an update. *Neurochem Res* 2005;30:1615–21.

Allen AM, Moeller I, Jenkins TA, Zhuo J, Aldred GP, Chai SY, Mendelsohn FAO: Angiotensin receptors in the nervous system. *Brain Res Bull* 1998;47:17–28.

Arao T, Tamura H. Dehydrogenase Type 2 Activity in Human Placental Choriocarcinoma Cells , JEG-3. 2011;57(5):436-441.

Araújo MA, Menezes BS, Lourenço C, Cordeiro ER, Gatti RR, Goulart LR. O poliformismo A1166C do receptor tipo 1 da angiotensina II no infarto agudo do miocárdio. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2004;83(5):404-08.

Ashton N. Perinatal development and adult blood pressure. *Brazilian journal of medical and biological research*. 2000;33(7):731-40.

Averill DB Angiotensin peptides and baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata. *Brain Res Bull*. 2000 Jan 15;51(2):119-28

Balkan J, Kanbagli O, Aykac-Toker G, Uysal B. Taurine treatment reduces hepatic lipids and oxidative stress in chronically ethanol-treated rats. *Biol Pharm Bull*. 2002; 25: 1231-1233.

Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)*. 1998;95:115-28.

Barker DJ. Intrauterine programming of adult disease. *Mol Med Today*. 1995a 1(9); 418-23.

Barker DJ. The fetal and infant origins of disease. *Eur J Clin Invest.* 1995b;25:457-63.

Barker DJP, Osmond C, Forsen TJ, Kajantie E, Eriksson JG. Maternal and social origins of hypertension. *Hypertension* 2007 Sep;50(3):565-71.

Barker, DJP, Osmond, C, Golding, J. Kuh, D, Wadsworth, MEJ. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ.* 1989;298:564-67.

Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet.* 1986 May 10;1(8489):1077-81.

Bearler SL. Acute hypertensive and natriuretic responses following preoptic hypothalamic lesions. *Am J Med Sci.* 1988;295:346-51.

Beckstead RM, Norgren R. An autoradiographic examination of the central distribution of the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagal nerves in the monkey. *J Comp Neurol.* 1979;365:556-74.

Benediktsson R; Lindsay RS; Noble J.; Seckl JR; Edwards CRW. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet.* 1993; 341:339-341.

Bennis-Taleb N, Remacle C, Hoet JJ, Reusens B. A low-protein isocaloric diet during gestation affects brain development and alters permanently cerebral cortex blood vessels in rat offspring. *The Journal of nutrition* 1999 Aug;129(8):1613-9.

Bertram C. Trowern AR, Copin N, Jackson AA, Whorwood CB. The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. *Endocrinology.* 2001; 142, 2841-2853.

Birdsall TC. Therapeutic applications of taurine. *Altern Med Rev.* 1998;3:128-36.

Bockelmann R, Reiser M, Wolf G. Potassium-stimulated taurine release and nitric oxide synthase activity during quinolinic acid lesion of the rat striatum. *Neurochem Res.* 1998;23:469–75.

Boer P A, Ueno M, Santána J S M, Saad M J A, Gontijo J A R. Expression and localization of NK<sub>1</sub>R, substance P and CGRP are altered in dorsal root ganglia neurons of spontaneously hypertensive rats (SHR). *Molecular brain research.* 2005 ; 138 35-44.

Boujendar S, Arany E, Hill D, Remacle C, Reusens B. Taurine supplementation of a low protein diet fed to rat dams normalizes the vascularization of the fetal endocrine pancreas. *J Nutr.*2003; 133:2820-2825.

Boujendar S, Reusens B, Merezak S, Ahn M-T, Arany E, Hill D, Remacle C. Taurine supplementation to a low protein diet during foetal and early postnatal life restores a normal proliferation and apoptosis of rat pancreatic islets. *Diabetologia* 2002 Jun;45(6):856-66.

Bourque CW, Ciura S, Trudel E, Stachniak TJE, Sharif-Naeini R. Neurophysiological characterization of mammalian osmosensitive neurones. *Experimental physiology* 2007;92(3):499-505.

Bourque CW. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nature Reviews Neuroscience*. 2008; 9,519-31.

Brown LD, Green AS, Limesand SW, Rozance PJ. Maternal amino acid supplementation for intrauterine growth restriction. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011; 1;3:428-44.

Buhimschi IA, Buhimschi CS, Pupkin M, Weiner CP. Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;189:181-188.

Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 2010;doi:10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016.

Campos Jr R, Colombari E, Cravo S, Lopes OU. Hipertensão arterial : o que tem a dizer o sistema nervoso. 2001 *Rev Bras Hipertens* vol 8(1):41-54.

Carey RM. Update on the role of the AT2 receptor. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005;14:67–71.

Carvalho-Filho MA, Carnevalheira JBC, Velloso LA, Saad MJA. Cross- talk das vias de insulina e angiotensina II: implicações com a associação entre diabetes mellitus e hipertensão arterial e doença cardiovascular. *Arquivo brasileiro de endocrinologia e metabolismo*. 2007;51(2):195-203.

Castro CH, Santos RAS, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP. Evidence for a functional interaction of the Angiotensin- (1-7) receptor with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. *Journal of the american heart association*. 2005;46:937-42.

Chan RKW, Sawchenko PE. Organization and transmitter specificity of medullary neurons activated by sustained hypertension: implications for understanding baroreceptor reflex circuitry. *J Neurosci* 1998;18:371-87.

Chappell MC, Brosnihan KB, Diz DI e Ferrario CM. Identification of angiotensin-(1–7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. *Journal of Biological Chemistry*. 1989; 264:16518–23.

Chappell MC, Brosnihan KB, Welches WR e Ferrario CM. Characterization by high performance liquid chromatography of angiotensin peptides in the plasma and cerebrospinal fluid of the dog. *Peptides*. 1987;8:939–42.

Chen QH, Toney GM. AT1-receptor blockade in the hypothalamic PVN reduces central hyperosmolality-induced renal sympathoexcitation. *AmJ Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;281:R1844–R1853.

Chepkova AN, Doreulee N, Yanovskyy, Mukhopadhyay D, Haas HL, Sergeeva OA. Long-lasting enhancement of corticostriatal neurotransmission by taurine. *Eur. J. Neurosci*. 2002;16:1523–30.

Cherif H, Reusens B, Ahn M-t, Hoet J-j, Remacle C. Effects of taurine on the insulin secretion of rat fetal islets from dams fed a low-protein diet. 1998;341-348.

Chesney RW, Helms RA, Christensen M et al. The role of taurine in infant nutrition. *AdvExp MedBiol*. 1998; 442:363–76.

Chiarla C, Giovannini I, Siegel JH, Boldrini G, Castagneto M. The relationship between plasma taurine and other amino acid levels in human sepsis. *J Nutr*. 2000;130:2222-7.

Ciampone S, Borges R, De Lima IP, Mesquita FF, Cambiucci EC, Gontijo JA. Long-term exercise attenuates blood pressure responsiveness and modulates kidney angiotensin II signalling and urinary sodium excretion in SHR. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2011;12(4):394-403

Cianfarani S, Germani D, Branca F Low birthweight and adult insulin resistance: the "catch-up growth" hypothesis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*(1999). 81:F71-73.

Colivicchi MA, Bianchi L, Bolam JP, Galeffi F, Frosini M, Palmi M et al. The in vivo release of taurine in the striatonigral pathway. *Adv Exp Med Biol*. 1998; 442:363–70.

Contra HS, Estrada LR, Chávez AG, Hernández HH. O sistema renina-angiotensina-aldosterona e seu papel funcional além do controle da pressão arterial. *Revista mexicana de cardiologia*. 2008;19(1):21-29.

Dagan A, Gattineni J, Cook V, Baum M. Prenatal programming of rat proximal tubule Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger by dexamethasone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292: R1230-R1235

Dampney RAL. The subretrofacial vasomotor nucleus: anatomical, chemical and pharmacological properties and role in cardiovascular regulation. *Prog Neurobiol*. 1994;42:197–227.

Daviet L, Horiuchi M, Hayashida W, Lethonen JYA, Bishopric NH, Dzau VJ: Antagonistic actions of type-1 and type-2 angiotensin II receptors on rat cardiomyocyte apoptosis. *Circulation* 1998; 98 (Suppl 1): I-741.

de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW & Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors 2000. *Pharmacol Rev* 52, 415–472.

Del Olmo N, Galaretta M, Bustamente J, Martin Del Rio R, Solis JM. Taurine-induced synaptic potentiation: role of calcium and interaction with LTP. *Neuropharmacology*. 2000;39:40–54.

Deleuze C, Duvoid A, Hussy N. Properties and glial origin of osmotic-dependent release of taurine from the rat supraoptic nucleus. *J Physiol*. 1998;507:463–71.

Demediuk P, Daly MP, Faden AI. Effect of impact trauma on neurotransmitter and nonneurotransmitter amino acids in rat spinal cord. *J Neurochem*. 1989;52:1529–36.

Dorn J, Antunes-Rodrigues J, McCann S M. Natriuresis in the rat following intraventricular carbachol. *Am J Physiol*. 1970; 219: 1292–98.

Dorward PK, Rudd CD. Influence of brain renin–angiotensin system on renal sympathetic and cardiac baroreflexes in conscious rabbits. *American Journal of Physiology*. 1991;260:H770–H778.

Duarte AI, Moreira PI, Oliveira CR. Insulin in Central Nervous System : More than Just a Peripheral Hormone. 2012;2012

Edwards LJ, Coulter CL, Symonds ME, Mcmillen IC. Pre-natal undernutrition, glucocorticoids and the programming of adult hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001;28:938–41.

Edwards LJ, Simonetta G, Owens JA, Robinson JS, Mcmillen IC. Restriction of placental and fetal growth in sheep alters fetal blood pressure responses to angiotensin II and captopril. *J Physiol*. 1999; 515:897–904

Eriksson JG, Forsen TJ, Kajantie E, Osmond C, Barker DJ. Childhood growth and hypertension in later life. *Hypertension*. Jun 2007;49(6):1415–1421

Eriksson JG. Proved association between low birth weight and coronary disease in adulthood. Too quick weight gain can disturb the muscle-fat balance. *Lakartidningen* 2001 Nov 21;98(47):5306–7, 5310.

Eichenwald EC, Stark AR. Management and outcomes of very low birth weight. *N Engl J Med*. 2008 Apr 17;358(16):1700-11.

Eremia SC, De Boo HA, Bloomfield FH, Oliver MH, Harding JE. Fetal and Amniotic Insulin-Like Growth Factor-I Supplements Improve Growth Rate in Intrauterine Growth Restriction Fetal Sheep. *Endocrinology*. 2007; 148:2963–2972.

Esteban M a, Xu J, Yang J, Peng M, Qin D, Li W, Jiang Z, Chen J, Deng K, Zhong M, Cai J, Lai L, Pei D. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. [Internet]. *The Journal of biological chemistry* 2009 Jun;284(26):17634-40.

Feldberg W, Guertzenstein PG. Blood pressure effects of leptazol applied to the ventral surface of the brain stem of cats. *J Physiol*. 1986;372:445-56.

Feldberg W, Guertzenstein PG. Vasodepressor effects obtained by drugs acting in the ventral surface of the brain stem. *J Physiol*. 1976;258:337-55.

Foos TM, Wu JY. The role of taurine in the central nervous system and the modulation of intracellular calcium homeostasis. *Neurochem Res*. 2002;27:21-26.

Forrester T. Historic and early life origins of hypertension in africans. *J Nutr* 2004;134:211–6.

Fox, SI. *Fisiologia humana*. Barueri: Manole; 2007.

Galaretta M, Bustamante J, Martin Del Río R, Solis JM. Taurine induces a long-lasting increase of synaptic efficacy and axon excitability in the hippocampus. *J. Neurosci*. 1996;16:92-102.

Gao L, Wang W-Z, Wang W, Zucker IH. Imbalance of angiotensin type 1 receptor and angiotensin II type 2 receptor in the rostral ventrolateral medulla: potential mechanism for sympathetic overactivity in heart failure. *Hypertension* 2008 Oct;52(4):708-14.

Giesta A, Palma I, Ramos MH. Sistema Renina-angiotensina-aldosterona e sua modulação farmacológica. *Acta Med. Port*. 2010;23:677-88.

Gilbert S, editor. 2003. *Developmental biology*. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates Incorporation.

Gluckman PD, Butler JH, Comline R, Fowden A. The effects of pancreatectomy on the plasma concentrations of insulin-like growth factors 1 and 2 in the sheep fetus. *J Dev Physiol*. 1987; 9:79–88.

Gluckman PD, Hanson MA. The consequences of being born small - an adaptive perspective. *Horm Res* 2006. 65 Suppl 3:5-14.



Godfrey K, Robinson S, Barke DJ, Osmond C, Cox V. Maternal nutrition in early and late pregnancy in relation to placental and fetal growth. *BMJ*. 1996; 17;312(7028):410-4.

Gontijo JAR, Garcia WE, Figueiredo JF, Silva-Netto CR, Furtado MRF. Renal sodium handling after noradrenergic stimulation of the lateral hypothalamus area in rats. *Brazilian J Med Biol Res*, 1992; 25:937-942.

Goodfellow J, Bellamy MF, Gorman ST, Brownlee M, Ramsey MW, Lewis MJ, Davies DP, Henderson AH. Endothelial function is impaired in fit young adults of low birth weight. *Cardiovasc Res*. 1998 Dec;40(3):600-6.

Grob M, Trottier JF, Drolet G e Mougnot D. Characterization of the neurochemical content of neuronal populations of the lamina terminalis activated by acute hydromineral challenge. *Neuroscience*. 2003;122:247–57.

Guertzenstein PG e Lopes OU. Cardiovascular responses evoked from the nicotine-sensitive area on the ventral surface oblongata in the cat. *J Physiol*. 1984;347:345-60.

Guertzenstein PG e Silver A. Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. *J Physiol*. 1974;242:489-503.

Guertzenstein PG. Blood pressure effects obtained by drugs applied to the ventral surface of the brain stem. *J Physiol*. 1973;229:395-408.

Guron G, Marcussen N, Nilsson A, Sundelin B, Friberg P. Postnatal timeframe for renal vulnerability to enalapril in rats. *J Am SocNephrol*. 1999; 10:1550-1560.

Guron G, Nilsson A, Nitescu N, Nielsen S, Sundelin B, Frokiaer J, et al. Mechanisms of impaired urinary concentrating ability in adult rat treated neonatally with enalapril. *ActaPhysiolScand*. 1999; 165:103-112.

Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. 2006;7(May):335-346.

Guyton AC e Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. Editora Elsevier; 2006.

Haas HL, Hosli L. The depression of brain stem neurons by taurine and its interaction with strychnine and bicuculline. *BrainRes*. 1973;52:399–402.

Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *British medical bulletin* 2001 Jan;60:5-20.

Hamilton RB, Norgren R. Central projections of gustatory nerves in the rat. *J Comp Neurol*. 1984;222:560-77.

Hanson SH. The role of taurine in diabetes and the development of diabetes complications. *Diabetes Metabolism. Research and Reviews*. 2001;17:330-46.

Hannan RE, Davis EA, and Widdop RE. Functional role of angiotensin II AT2 receptor in modulation of AT1 receptor-mediated contraction in rat uterine artery: involvement of bradykinin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 2003;40:987–995.

Head GA, Saigusa T, and Mayorov DN. Angiotensin and baroreflex control of the circulation. *Braz J Med Biol Res* 2002.35: 1047–1059.

Heird WC. Taurine in neonatal nutrition revisited. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition*. 2004;89(6):473-74.

Herculano-Houzel S e lent R. Isotropic fractionator: a simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. *J Neurosci* (2005); 25(10): 2518-2521.

Horie R, Yamori Y, Nara Y, Sawamura M, Mano M Effect of sulphur amino acids on the development of hypertension and atherosclerosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens Suppl*. 1987; 5: S223-5

Horikoshi T, Asanuma A, Yanagisawa K, Anzai K, Goto S. Taurine and b-alanine act on both GABA and glycine receptors in *Xenopus* oocyte injected with mouse brain messenger RNA. *Mol. Brain Res*. 1988;10:83–92.

Horiuchi M, Hamai M, Cui TX, Iwai M, Minokoshi Y. Cross talk between angiotensin II type 1 and type 2 receptors: cellular mechanism of angiotensin type 2 receptor-mediated cell growth inhibition. *Hypertens Res*. 1999 Jul;22(2):67-74.

Hu J, Xu X, Yang J, Wu G, Sun C, Lv Q. Antihypertensive effect of taurine in rat. *Adv Exp Med Biol*, 2009; 643:75-84.

Hu L, Zhu D-N, Yu Z, Wang JQ, Sun Z-J, Yao T. Expression of angiotensin II type 1 (AT(1)) receptor in the rostral ventrolateral medulla in rats. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) 2002 May;92(5):2153-61.

Hu JM, Rho JY, Suzuki M, Nishihara M & Takahashi M. Effect of taurine in rat milk on the growth of offspring. *J VetMed Sci*. 2000; 62, 693–698.

Huang BS, Leenen FH. Sympathoexcitatory and pressor responses to increased brain sodium and ouabain are mediated via brain Ang II. *American Journal of Physiology*. 1996;270,H275–H280.

- Huang C, Johns EJ. Role of Brain angiotensin II in the somatosensory induced antinatriuresis in the anaesthetized rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2000; 27,191–96.
- Hussy N, Bres V, Rochette M, Duvoid A, Alonso G, Dayanithi G, Moos F. Osmoregulation of vasopressin secretion via activation of neurohypophyseal nerve terminals glycine receptors by glial taurine. *J. Neurosci*. 2001;21:7110–16.
- Hussy N, Deleuze C, Pantaloni A, Desarmenien MG, Moos F. Agonist action of taurine on glycine receptors in rat supraoptic magnocellular neurons: possible role in osmoregulation. *J. Physiol*. 1997;502:609–21.
- Huttenlocher PR, Dabholkar AS. Regional differences in syn- aptogenesis in human cerebral cortex. *J Comp Neurol*. 1997; 387:167–178
- Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev*. 1992;72:101–63.
- Hwang DF, Hour JL, Cheng HM. Effect of taurine on toxicity of oxidized fish oil in rats. *Food Chem Toxicol*. 2000; 38: 585-591.
- Hwang DF, Wang LC, Cheng HM. Effect of taurine on toxicity of copper in rats. *Food Chem Toxicol*. 1998; 36: 239-244.
- Hwang DF, Wang LC. Effect of taurine on toxicity of cadmium in rats. *Toxicol*. 2001;1 67: 173-180.
- Ideishi M, Miura S, Sakai T, Sadaguri M, Misumi Y, Arakawa K. Taurine amplifies renal kallikrein and prevents salt induced hypertension in Dahl rats. *J Hypertens* 1994; 12: 653-661
- Ikuyama S, Okajima T, Kato K & Ibayashi H. Effect of taurine on growth hormone and prolactin secretion in rats: possible interaction with opioid peptidergic system. *Life Sci*. 1988; 43, 807–812.
- Inoue A, Takahashi H, Lee LC, Iyoda I, Sasaki S, Okajima H, Takeda K, Yoshimura M, Nakagawa M, Ijichi H. Centrally induced vasodepressor and sympathetic nerve responses to taurine. *Jpn Circ J* 1985;49:1180–4.
- Sved AF, Ito S, Madden CJ. Baroreflex dependent and independent roles of the caudal ventrolateral medulla in cardiovascular regulation. *Brain Res Bull*. 2000 Jan 15;51(2):129-33.
- Ji Y, Tao L, Xu HL, Rao MR. Effects of taurine and enalapril on blood pressure, platelet aggregation and the regression of left ventricular hypertrophy in two-kidney-one-clip renovascular hypertensive rats. *Yao Xue Xue Bao*. 1995; 30: 886-890.

Jones JE, Jurgens, JA, Evans, SA, Ennis, RC, Villar, VA M, & Jose PA. Mechanisms of fetal programming in hypertension. *International journal of pediatrics*. 2012; 584831.

Joshi SR, Mehendale SS, Dangat KD, Kilari AS, Yadav HR, Taralekar VS. High maternal plasma antioxidant concentrations associated with preterm delivery. *Ann Nutr Metab*. 2008;53:276-82.

Junyent F, Utrera J, Romero R, Palla Prevention of Epilepsy by Taurine treatments in Mice Experimental Model. *Journal of Neuroscience Research*. 2009;87:1500-08.

Kajantie E, Osmond C, Barker DJP, Forsén T, Phillips DIW, Eriksson JG. Size at birth as a predictor of mortality in adulthood: a follow-up of 350 000 person-years. *International journal of epidemiology* 2005 Jun;34(3):655-63.

Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press*. 2003; 12:70–88.

Kohlenbach A, Schlicker E. GABAB receptor-mediated inhibition of the neurogenic vasopressor response in the pithed rat. *Br J Pharmacol* 1990;100:365–9.

Knuppel RA, Hassan MI, Mcdermott JJ, Tucker JM, Morrison JC. Oxidative Stress and Antioxidants : Preterm Birth and Preterm Infants. 2012;

Krause EG, Melhorn SJ, Davis JF, Scott KA, Ma LY, De Kloet AD et al. Angiotensin type 1 receptors in the subfornical organ mediate the drinking and hypothalamic-pituitary-adrenal response to systemic isoproterenol. *Endocrinology*. 2008;149(12):6416-24.

Kulthinee S, Wyss JM, Jirakulsomchok D, & Roysommuti S. High sugar intake exacerbates cardiac reperfusion injury in perinatal taurine depleted adult rats. *Journal of biomedical science*. 2010; 17 Suppl 1(Suppl 1), S22.

Lagranha CJ, Fiorino P, Casarini DE, Schaan BD, Irigoyen MC. Bases moleculares da glomerulopatia diabética. *Arquivo brasileiro de endocrinologia e metabolismo*. 2007;51(6):901-12.

Lampson WG, Kramer JH, Schaffer SW. Potentiation of the actions of insulin by taurine. *Can J PhysiolPharmacol*. 1983; 61:457–463.

Langley SC; Jackson AA. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Lond)*. 1994; 86(2):217-22.

Langley-Evans SC, Lilley C, McMullen S. Maternal protein restriction and fetal growth: lack of evidence of a role for homocysteine in fetal programming. *Br J Nutr*. 2006 Sep;96(3):578-86.

Langley-Evans S. Fetal growth markers may show nutritionally mediated effect. *BMJ*. 2001; 323(7303):52.

Langley-Evans SC, Langley-Evans AJ, Marchand MC. Nutritional programming of blood pressure and renal morphology. *Arch Physiol Biochem*. 2003 Feb;111(1):8-16.

Langley-Evans SC. Fetal origins of adult disease. *Br J Nutr*. 1999 Jan;81(1):5-6.

Langley-Evans SC, Gardner DS, Welham SJ. Intrauterine programming of cardiovascular disease by maternal nutritional status. *Nutrition*. 1998;14:39-47.

Langley-Evans SC, Jackson AA. Captopril normalizes systolic blood pressure in rats with hypertension induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 1995;110:223–28.

Langley-Evans SC, Phillips GJ, Benediktsson R, Gardner DS, Edwards CR, Jackson AA et al. Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. *Placenta*. 1996a; 17(2-3):169-72.

Langley-Evans SC, Phillips GJ, Jackson AA. In utero exposure to maternal low protein diets induces hypertension in weanling rats, independently of maternal blood pressure changes. *Clinical Nutrition*. 1994;13:319-24.

Langley-Evans SC, Welham SJ, Sherman RC, Jackson AA. Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 1996b;91(5):607-15.

Langley-Evans SC. Intrauterine programming of hypertension by glucocorticoids. *Life Sci*. 1997;60:1213-21.

Langley-Evans SC. Maternal carbenoxolone treatment lowers birthweight and induces hypertension in offspring of rats fed a protein replete diet. *Clin Sci*. 1997; 93: 423–9.

Larsson SH, Aperia A. Renal growth in infancy and childhood– experimental studies of regulatory mechanisms. *Pediatr Nephrol*. 1991; 5:439-442.

Lauand F, Ruginsk SG, Rodrigues HLP, Reis WL, Castro M De, Elias LLK, Antunes-Rodrigues J. Glucocorticoid modulation of atrial natriuretic peptide, oxytocin, vasopressin and Fos expression in response to osmotic, angiotensinergic and cholinergic stimulation. *Neuroscience*. 2007; 147, 247–257.

Lavoie JL, Liu X, Bianco RA, Beltz TG, Johnson AK, Sigmund CD. Evidence supporting a functional role for intracellular renin in the brain. *Hypertension*. 2006;47:461-6.

Law CM, Barker DJP, Bull AR, Osmond C. Maternal and fetal influences on blood pressure. *Arch Dis Child*. 1991; 61:1291-95.

Law CM, De Swiet M, Osmond C, Favers PM, Barker DJ, Cruddas AM et al. Initiation of hypertension in utero and its amplification throughout life. *BMJ*. 1993; 2: 306 24-7.

Lawrence A C, Clarke IJ, & Campbell DJ. Angiotensin peptides in brain and pituitary of rat and sheep. *Journal of Neuroendocrinology*. 1992;4, 237–244.

Lee N-Y, Kang Y-S. Regulation of taurine transport at the blood-placental barrier by calcium ion, PKC activator and oxidative stress conditions. *Journal of biomedical science* 2010 Jan;17 Suppl 1(Suppl 1):S37.

Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortes C. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: A functional neuroanatomical review. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 1997;18:383–439.

Lent, R. Cem bilhões de neurônios?: Conceitos fundamentais de neurociência. 2ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.

Lesage J, Blondeau B, Grino M, Breant B, Dupouy JP. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology*. 2001; 142, 1692–1702.

Leeson CP, Kattenhorn M, Morley R, Lucas A, Deanfield JE. Impact of low birth weight and cardiovascular risk factors on endothelial function in early adult life. *Circulation*. 2001 Mar 6;103(9):1264-8.

Li JM, Mogi M, Tsukuda K, Tomochika H, Iwanami J, Min LJ, Nahmias C, Iwai M, Horiuchi M. Angiotensin II-induced neural differentiation via angiotensin II type 2 (AT2) receptor-MMS2 cascade involving interaction between AT2 receptor-interacting protein and Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase 1. *Mol Endocrinol*. 2007; 21 (2), 499–511.

Li Z, Zharikova A, Vaughan CH, Bastian J, Zandy S, Esperon L, Axman E, Rowland NE, Peris J. NIH Public Access. 2011;142-153.

Limesand SW, Rozance PJ, Zerbe GO, Hutton JC, Hay WW. Attenuated insulin release and storage in fetal sheep pancreatic islets with intrauterine growth restriction. *Endocrinology* 2006 Mar;147(3):1488-97.

Lind RW, Swanson L W, Bruhn T O, & Ganten D. The distribution of angiotensin II-immunoreactive cells and fibers in the paraventriculo-hypophysial system of the

rat.Brain Research. 1985; 338, 81–89.

Lind RW, Thunhorst RL, Johnson AK. The subfornical organ and the integration of multiple factors in thirst. *Physiology and Behavior*. 1984;32,69–74.

Lingas R, Dean F, Matthews SG. Maternal nutrient restriction (48h) modifies brain corticosteroid receptor expression and endocrine function in the fetal guinea pig. *Brain Res*. 1996; 846: 236-242.

Li, J. H., Y. Q. Ling, J. J. Fan, X. P. Zhang and S. Cui Expression of cysteine sulfinic decarboxylase (CSD) in male reproductive organs of mice. *Histochem. Cell Biol*. 2006; 125, 607–613.

Liu HY, Chi FL, Gao WY. Taurine modulates calcium influx under normal and ototoxic conditions in isolated cochlear spiral ganglion neurons. *Pharmacol Rep*. 2000;60,508–13.

Lodygensky GA, Seghier ML, Warfield SK, Tolsa CB, Sizonenko S, Lazeyras F, Hu PS, Louis S, Trust W. Intrauterine Growth Restriction Affects the Preterm Infant's Hippocampus. 2008;63(4):438-443.

Lourenco R, Camilo ME. Taurine: a conditionally essential amino acid in humans? An overview in health and disease. *NutrHosp*. 2002;17(6):262-70.

Lucas A. Programming by early nutrition in man. In: Langley-Evans SC. Fetal nutrition and adult Disease. *Frontiers in nutritional science*. 2004;02:01-16.

Lucas A, Stafford M, Morley R, Abbott R, Stephenson T, MacFadyen U, Elias-Jones A, Clements H. Efficacy and safety of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of infant-formula milk: a randomised trial. *Lancet*. 1999 Dec 4;354(9194):1948-54.

Lumbers ER: Development of renal function in the fetus: a review. *Reprod Fertil Dev* 1995, 7:415-426.

Macdonald AA, Colenbrander B, Wensing CJ. The effects of gestational age and chronic fetal decapitation on arterial blood pressure in the pig fetus. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod*. 1983; Biol. 16, 63–70.

Machado CRS. Tecido nervoso. In: MACHADO, A. *Neuroanatomia funcional*. 2. ed. São Paulo: Ateneu, 2000. p. 7-12

Mahon JM, Allen M, Herbert J, Fitzsimons JT. The association of thirst, sodium appetite and vasopressin release with c-fos expression in the forebrain of the rat after i.c.v. injection of angiotensin II, angiotensin-(1–7) or carbachol. *Neuroscience*. 1995; 69, 199–208.

Malaisse WJ, Hutton JC, Carpinelli AR, Herchuelz A, Sener A. The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release: metabolism and cationic effects of leucine. *Diabetes*.1980; 29:431–437.

Maloney SE, Noguchi KK, Wozniak DF, Fowler SC, Farber NB. Long-term Effects of Multiple Glucocorticoid Exposures in Neonatal Mice. *Behavioral sciences* 2011 Dec;1(1):4-30.

Mantovani J & DeVivo DC. Effects of taurine on seizures and growth hormone release in epileptic patients. *Arch Neurol*. 1979;36, 672–674.

Mao C, Shi L, Xu F, Zhang L, Xu Z. Development of fetal brain renin-angiotensin system and hypertension programmed in fetal origins. *Prog Neurobiol*. 2009 Apr;87(4):252-63.

Manning J, Vehaskari VM Low birth weight-associated adult hypertension in the rat. (2001) *Pediatr Nephrol* 16:417–422

Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P & Bernstein KE. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature*. 1995; 375 247–250.

Mathai ML, Evered MD, Mckinley M. Central losartan blocks natriuretic, vasopressin, and pressor responses to central hypertonic NaCl in sheep. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1998; 275: R548-R554.

Matthews SG. Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends Endocrinol Metab*. 2002; Nov;13(9):373-80.

May CN, Mcallen RM, & Mckinley MJ. Renal nerve inhibition by central NaCl and Ang II is abolished by lesions of the lamina terminalis. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2000; 279, R1827–R1833.

May CN, Mcallen RM. Baroreceptor-independent renal nerve inhibition by intracerebroventricular angiotensin II in conscious sheep. *American Journal of Physiology*. 1997a;273,R560–R567.

May CN, Mcallen RM. Brain angiotensinergic pathways mediate renal nerve inhibition by central hypertonic saline in conscious sheep. *American Journal of Physiology*. 1997b;272,R593–R600.

Mccarty MF. Complementary vascularprotective actions of magnesium and taurine: a rationale for magnesium taurate. *Medical Hypothesis*.1996;46:89-100.



Mccarty MF. Exploiting complementary therapeutic strategies for the treatment of type II diabetes and prevention of its complications. *Med Hypotheses*. 1997; 49:143–152.

Mckinley M J, Mcallen R M, Mendelsohn F A O, Allen A M, Chai S Y & Oldfield B J. Circumventricular organs: Neuroendocrine interfaces between the brain and the hemal milieu. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 1990; 11,91–127.

Mckinley MJ, Albistorn AL, Allen AM, Mathai ML, May CN, Mcallen RM, et al. The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2003;35:901-18.

Mckinley MJ, Allen AM, May CN, Mcallen RM, Oldfield BJ, Sly D et al. Neural pathways from the lamina terminalis influencing cardio-vascular and body fluid homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001;28:990-92.

Mckinley MJ, Clevers J, Denton DA, Mendelsohn FA. Autoradiographic localization of angiotensin receptors in the sheep brain. *Brain Res*. 1986; Jun 11;375(2):373-6.

Mcmillen IC, Maclaughlin SM, Muhlhausler BS, Gentili S, Duffield JL, Morrison JL. Developmental origins of adult health and disease: the role of periconceptional and foetal nutrition. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008 Feb;102(2):82-9.

Mendez MA, Wynter S, Wilks R, Forrester T. Under- and over-reporting of energy is related to obesity, lifestyle factors and food group intakes in Jamaican adults. *Public Health Nutr* 2004;7:9–19.

Mesquita FF, Gontijo JA, Boer PA. Expression of renin-angiotensin system signaling compounds in maternal protein-restricted rats: effect on renal sodium excretion and blood pressure. *Nephrol Dial Transplant* (2010a); 25(2):380-8.

Mesquita FF, Gontijo JA, Boer PA. Maternal undernutrition and the offspring kidney: from fetal to adult life. *Braz J Med Biol Res*. (2010b); 43(11):1010-8.

Michelotto JB, Carnevali JB, Saad MJ & Gontijo JA. Effects of intracerebroventricular insulin microinjection on renal sodium handling in kidney-denervated rats. *Brain Research Bulletin*. 2002; 57 613–618.

Mewes AUJ, Hüppi PS, Als H, Rybicki FJ, Inder TE, McAnulty GB, Mulkern RV, Robertson RL, Rivkin MJ, Warfield SK. Regional brain development in serial magnetic resonance imaging of low-risk preterm infants. *Pediatrics* 2006 Jul;118(1):23-33.

Millan MA, Jacobowitz DM, Aguilera G, Catt KJ. Differential distribution of AT1 and AT2 angiotensin II receptor subtypes in the rat brain during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88,11440–44.

Miura M, Reis DJ. Role of solitary and paramedian reticular nuclei in mediating cardiovascular reflex responses from carotid baroreceptors and chemoreceptors. *J Physiol.* 1972;223(2):525-48.

Mizushima S, Nara Y, Sawamura M, Yamori Y. Effects of oral taurine supplementation on lipids and sympathetic nerve tone. *Adv Exp Med Biol* 1996;403:615–22. [PubMed: 8915402]

Moellenhoff E, Blume A, Culman J et al. Effect of repetitive icv injections of AngII on c-fos and AT(1)-receptor expression in the brain. *Am J Physiol.* 2001; 280: R1095–R1104.

Monteiro JL. Revisão/Atualização em Fisiologia e Fisiopatologia Renal: Fisiopatologia da síndrome hépato-renal. *J. Bras. Nefrol.* 1998; 20(2) 174-177.

Morsing E, Asard M, Ley D, Stjernqvist K, Marsál K. Cognitive function after intrauterine growth restriction and very preterm birth. *Pediatrics* 2011 Apr;127(4):e874-82.

Mozaffari MS, Tan BH, Lucia MA, Schaffer SW. Effect of drug induced taurine depletion on cardiac contractility and metabolism. *BiochemPharmacol.*1986; 35: 985–989.

Mungall BA, Shinkel TA, Sernia C. Immunocytochemical localization of angiotensinogen in the fetal and neonatal rat brain. *Neuroscience.* 1995; 67, 505–524.

Nandhini AT, Balakrishnan SD, Anuradha CV. Response of liver antioxidant system to taurine in rats fed high fructose diet. *Indian J ExpBiol.* 2002; 40:1016-19.

Noguchi KK, Walls KC, Wozniak DF, Olney JW, Roth KA, Farber NB. NIH Public Access. 2009;15(10):1582-1592.

Norberg S, Powell TL, Jansson T. Intrauterine growth restriction is associated with a reduced activity of placental taurine transporters. *Pediatr Res.* 1998; 44:233-238.

Nosarti C, Al-asady MHS, Frangou S, Stewart AL, Rifkin Murray RM. “Adolescents who were born very preterm have decreased brain volumes,” *Brain.* 2002; vol. 125, no. 7, pp. 1616–1623.

Novakova A, Stevenson JAF. Effect of posterior hypothalamus lesions on renal function in the rat. *Canad J Physiol Pharmacol.* 1971;49:941-50.

Nuyt AM, Lenkei Z, Corvol P, Palkovits M, Llorens-Cortes C. Ontogeny of angiotensin II type 1 receptor mRNAs in fetal and neonatal rat brain. *J Comp Neurol.* 2001; 440: 192–203.

Nyengaard JR, Bendtsen TF. Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *Anat Rec.* 1992; 232:194-201.

O'Donovan DJ, Fernandes CJ. Free radicals and diseases in premature infants. *Antioxidants and redox signaling* 2004;6(1):169-176.

O'donnell D, Larocque S, Seckl JR, Meaney MJ. Postnatal handling alters glucocorticoid, but not mineralocorticoid messenger RNA expression in the hippocampus of adult rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 1994; 26 (1-2): 242-8.

Ogata ES, Bussey ME, Finley S. Altered gas exchange, limited glucose and branched chain amino acids, and hypoinsulinism retard fetal growth in the rat. *Metabolism.* 1986; 35:970–977.

Oja SS, Saransaari P. Modulation of taurine release by glutamate receptors and nitric oxide. *Prog.Neurobiol.* 2000;62:407-25.

Ojeda NB, Grigore D, Hennington BS, e Alexander, BT. Pre-natal programming of blood pressure and hypertension. *Rev Bras Hipertens.* 2008;15(1):3-8.

Okamoto K, Tabei R, Fukushima M, Nosaka S, Tamori Y,Maruyama T, Suzuki Y, Tamegai M. Ichijima K, Haebara H, Matsumoto, Further observations of the development of spontaneously hypertensive rats. *Jap Circ J* 1996; 30:703-716.

Oldfield BJ, Allen AM, Hards DK, Mckinley MJ, Schlawe I, e Mendelsohn FAO. Distribution of angiotensin II receptor binding in the spinal cord of the sheep. *Brain Research.* 1994;650:40–48.

Oliveira MWS, Minotto JB, Oliveira MR, Zanutto A, Behr GA, Rocha RF et al. Scavenging and antioxidant potential of physiological taurine concentrations against different reactive oxygen/nitrogen species. *Pharmacological Reports.* 2010;62:185-93.

Olson James E, Eduardo Martinho JR. Regulation of taurine transport in rat hippocampal neurons by hypoosmotic swelling. *Journal of Neurochemistry.* 2006; 96:1375-1389.

Oparil S. The sympathetic nervous system in clinical and experimental hypertension.*Kidney Int.* 1986; 30: 437-452.

Oz Murat and Renaud Leo P. Angiotensin AT1-receptors depolarize neonatal spinal motoneurons and other ventral horn neurons via two different conductances. *J Neurophysiol.* 2002; 88: 2857–2863.

Padilla BE, Dominguez G, Millan C, Bignon H, Buela E, Bellia G, Elias ME, Albertal M, Martinez-Ferro M. Initial Experience with Magnet-Assisted Single Trocar Appendectomy in Children. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2012 Jun 27.

Parcell, S. Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern. Med. Rev.* 2002;7:22-44.

Park, E., S. Y. Park, C. Wang, J. Xu, G. LaFauci and G. Schuller-Levis: Cloning of murine cysteine sulfinic acid decarboxylase and its mRNA expression in murine tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002 1574, 403–406.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Elsevier; 2005.

Persson E, Jansson T. Low birth weight is associated with elevated adult blood pressure in the chronically catheterized guinea-pig. *Acta Physiol Scand*. 1992; 145(2):195-6.

Peterson BS, Anderson AW, Ehrenkranz R, et al., "Regional brain volumes and their later neurodevelopmental correlates in term and preterm infants," *Pediatrics*. 2003; vol. 111, no. 5, part I, pp. 939–948.

Pilowsky, P. M. & Goodchild, A. K. Baroreceptor reflex pathways and neurotransmitters: 10 years on. *J. Hypertens*. 2002; 20, 1675–1688

Pinheiro A, Canton M, Montenegro LR, Jorge I, Arnhold P, Augusto A, Jorge DL. Mutações no gene do receptor do fator de crescimento insulina-símile 1 (IGF1R) como causa de retardo do crescimento pré- e pós-natal. 2011;1(1):541-549.

Phillips MI, Sumners C. Angiotensin II in central nervous system physiology. *Regul Pept*. 1998; 78: 1–11.

Pladys P, Lahaie I, Cambonie G, Thibault G, Le NL, Abran D, Nuyt AM. Role of brain and peripheral angiotensin II in hypertension and altered arterial baroreflex programmed during fetal life in rat. *Pediatr Res* 2004; 55, 1042–1049.

Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res*. 1993; 18(3):195-200.

Poladia DP, Kish K, Kutay B, Bauer J, Baum M, Bates CM. Link between reduced nephron number and hypertension: studies in a mutant mouse model. *Pediatr Res* 2006;59:489-93.

Prentice AM. Can maternal dietary supplements help in preventing infant malnutrition? *Acta Paediatr Scand*. 1991;374:67-77.

Provencher PH, Saltis J, FUNDER, JW. Glucocorticoids but not mineralocorticoids modulate endothelin-1 and angiotensin II binding in SHR vascular smooth muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995; 52(3):219-25.

Racasan, Braam B, Van Der Giezen DM, Goldschmeding R, Boer P, Koomans H A et al. Perinatal L-arginine and antioxidant supplements reduce adult blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2004; 44:83-88.

Rahman MM, Park HM, Kim SJ, Go HK, Kim GB, Hong CU, Lee YU, Kim SZ, Kim JS, Kang HS. Taurine prevents hypertension and increases exercise capacity in rats with fructose-induced hypertension. *Am J Hypertens* 2011; 24:574- 581.

Ray PE, Castren E, Ruley EJ & Saavedra J M. Different effects of sodium or chloride depletion on angiotensin II receptors in rats. *American Journal of Physiology*, 1990; 258, R1008–R1015.

Reaux A, De Mota N, Zini S, Cadel S, Fournie-Zaluski MC, Roques B P, Corvol, P, & Llorens-Cortes C. PC18, a specific aminopeptidase N inhibitor, induces vasopressin release by increasing the half-life of brain angiotensin III. *Neuroendocrinology*. 1999a; 69, 370–376.

Reaux A, Fournie-Zaluski MC, David C, Zini S, Roques BP, Corvol P, & Llorens-Cortes C. Aminopeptidase A inhibitors as potential central antihypertensive agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999b; 96, 13415–13420.

Reusens B, Sparre T, Kalbe L, Bouckenooghe T, Theys N, Nerup J, Remacle C. The intrauterine metabolic environment modulates the gene expression pattern in fetal rat islets : prevention by maternal taurine supplementation. 2008;836-845.

Ribeiro JM, Florêncio LP. Bloqueio farmacológico do sistema renina- angiotensina- aldosterona: inibição da enzima de conversão e antagonismo do receptor de AT1. *Revista brasileira de hipertensão*. 2000;7(3):293-302.

Ribeiro RA, Bonfleur ML, Amaral AG, Vanzela EC, Rocco SA, Boschero AC, Carneiroe. M. Taurine supplementation enhances nutrient-induced insulin secretion in pancreatic mice islets. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009; 25 (4): 370-379.

Roysommuti S, Suwanich A, Lerdweeraphon W, Thaeomor A, Jirakulsomchok D, Wyss JM. Sex dependent effects of perinatal taurine exposure on the arterial pressure control in adult offspring. *Adv Exp Med Biol*. 2009; 643:135-144.

Roysommuti S, Malila P, Jirakulsomchok D, Jirakulsomchok S, Wyss JM. Perinatal taurine status influences renal hemodynamics in adult conscious rats. *FASEB J* 2004;18 (4 Part I):A292–3.

Rozance PJ, Crispo MM, Barry JS, O'meara MC, Frost MS, Hansen KC, Hay WW JR, Brown LD. Prolonged maternal amino acid infusion in late-gestation pregnant sheep increases fetal amino acid oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 297:E638–E646.

Rubio-navarro L, Torrero C, Salas M. Basic brainstem taste responsivity : effects of perinatal influences Respuestas gustativas del tallo cerebral : efectos de influencias perinatales. *Neurobiologia - Revista electrónica* 2011;2(3).

Sahajpal V, AshtonN. Increased glomerular angiotensin II binding in rats exposed to a maternal low protein diet in utero. *J Physiol.* 2005;563(1):193–201.

Saigusa T, Granger NS, Godwin SJ, and Head GA. The rostral ventrolateral medulla mediates sympathetic baroreflex responses to intra- ventricular angiotensin II in rabbits. *Auton Neurosci* 2003 107: 20–31.

Saigusa T, Iriki M, and Arita J. Brain angiotensin II tonically modulates sympathetic baroreflex in rabbit ventrolateral medulla. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1996. 271: H1015–H102

Sandman CA, Davusm EP, Buss C. Prenatal programming of human neurological function. *International Journal of Pepetides*, 2011.

Santos RAS, Sampaio WO. Sistema renina-angiotensina: aspectos fisiológicos. *Revista brasileira de hipertensão.* 2002;5(2):52-8.

Sato Y, Ando K, Fujita T. Role of sympathetic nervous system in hypotensive action of taurine in DOCA- salt rats. *Hypertension* 1987;9:81–7

Satoh H. Cardioprotective actions of taurine against intracellular and extracellular calciuminduced effects. *AdvExp Med Biol.* 1994; 359:181-96.

Schaffer SW, Jong CJ, Ramila KC, Azuma J. Physiological roles of taurine in heart and muscle. *Journal of biomedical science* 2010 Jan;17 Suppl 1(Suppl 1):S2.

Schaffer S, Takahashi K, Azuma J. Role of osmoregulation in the actions of taurine. *Amino Acids.* 2000;19:527-46.

Schaffer SW, Azuma J, Mozaffari M. Role of antioxidant activity of taurine in diabetes. *Can J PhysiolPharmacol.* 2009; 87:91-99.

Schuller-Levis GB, Park E. Taurine: new implications for an old amino acid. 24. *FEMS MicrobiolLett.* 2003;226:195-202.

Schulman IH, Raij L. The angiotensin II type 2 receptor: what is its clinical significance? *Curr Hypertens Rep*, 2008; 10: 188–193

Sergeeva OA, Chepkova AN, Doreulee N, Eriksson KS, Poelchen W, Monnighoff I et al. Taurine-induced long-lasting enhancement of synaptic transmission in mice: role of transporters. *J. Physiol.* 2003;550:911–19.

Sergeeva O a, Fleischer W, Chepkova a N, Warskulat U, Häussinger D, Siebler M, Haas HL. GABAA-receptor modification in taurine transporter knockout mice causes striatal disinhibition. *The Journal of physiology* 2007 Dec;585(Pt 2):539-48.

Shi P, Stocker SD, Toney GM. Organum vasculosum laminae terminalis contributes to increased sympathetic nerve activity induced by central hyperosmolality. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 2007;293(6):R2279-89.

Singewald N, Kouvelas D, Chen F, Philippu A. The release of inhibitory amino acids in the hypothalamus is tonically modified by impulses from aortic baroreceptors as a consequence of blood pressure fluctuations. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1997; 356:348-355.

Siragy HM, Carey RM. The subtype-2 (AT2) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest.* 1997;100:264 – 269.

Suzuki, T., T. Suzuki, T. Wada, K. Saigo and K. Watanabe (2002): Taurine as a constituent of mitochondrial tRNA: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *EMBO J.*, 21, 6581–6589.

Stein P, Scholl TO, Schluter MD, et al. Oxidative stress early in pregnancy and pregnancy outcome. *Free Res.* 2088;42:841-8.

Sturman JA .Taurine in development. *J Nutr.* 1988 Oct;118(10):1169-76.

Sturman JA, Gargano AD, Messing JM, Imaki H. Feline maternal taurine deficiency: effect on mother and offspring. *J Nutr.* 1986; 116:655–667.

Sturman JA. Taurine in development. *Physiol Rev.* 1993;73:119-47.

Tang XC, Rao MR, Wang H. Alterations of amino acid levels from striatum, hippocampus, and cerebral ischemia in gerbil. *ActaPharmacologicaSinica.* 2000;21:819-23.

Tappaz ML. Taurine biosynthetic enzymes and taurine transporter: molecular identification and regulations. *Neurochem Res.* 2004; 29:83-96. Telser AG. *Histologia.* Rio de Janeiro: Elsevier, Monte Alto Costa, 2004.

Tappaz, M., M. Bitoun, I. Reymond and A. Sergeant: Characterization of the cDNA coding for rat brain cysteine sulfinic acid decarboxylase: brain and liver enzymes are

identical proteins encoded by two distinct mRNAs. *J. Neurochem.* (1999), 73, 903–912.

Taranukhin AG, Taranukhina EY, Saransaari P, Podkletnova IM, Peltö-Huikko M, Oja SS. Neuroprotection by taurine in ethanol-induced apoptosis in the developing cerebellum. *Journal of biomedical science* 2010 Jan;17 Suppl 1(Suppl 1):S12.

Thibeault DW. The precarious antioxidant defenses of the preterm infant. *American Journal of Perinatology.* 2000;17:167-81.

Tolsa CB, Zimine S, Warfield SK, Freschi M, Rossignol ANAS, Lazeyras F, Hanquinet S, Pfizenmaier M, Hüppi PS. Early Alteration of Structural and Functional Brain Development in Premature Infants Born with Intrauterine Growth Restriction. 2004;56(1):1-7.

Trachtman H, Del Pizzo R, Rao P, Rujikarn N, Sturman JA. Am J Taurine lowers blood pressure in the spontaneously hypertensive rat by a catecholamine independent mechanism. *Am. J Hypertens.* 1989; 2: 909-12

Trachtman H, Del Pizzo R, Sturman JA, Huxtable RJ, Finberg L. Taurine and osmoregulation. II. Administration of taurine analogues affords cerebral osmoprotection during chronic hypernatremic dehydration. *American journal of diseases of children.* 1988;142(11):1194-8.

Tsutsumi, K, Saavedra, JM. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub>) in rat brain. *Am. J. Physiol.* 1991;261:R209–R216.

Tsuboyama-Kasaoka N, Shozawa C, Sano K, Kamei Y, Kasaoka S, Hosokawa Y, Ezaki O. Taurine (2-aminoethanesulfonic acid) deficiency creates a vicious circle promoting obesity. *Endocrinology.* 2006 Jul;147(7):3276-84.

Vehaskari VM, Manning J, Aviles DH. Prenatal programming of adult hypertension in the rat. (2001) *Kidney Int* 59:238–245

Wang W-Z, Gao L, Wang H-J, Zucker IH, Wang W. Interaction between cardiac sympathetic afferent reflex and chemoreflex is mediated by the NTS AT<sub>1</sub> receptors in heart failure. [Internet]. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2008 Sep;295(3):H1216-H1226.

Wang WZ, Gao L, Pan YX, Zucker IH, Wang W. AT<sub>1</sub> receptors in the nucleus tractus solitarius mediate the interaction between the baroreflex and the cardiac sympathetic afferent reflex in anesthetized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007 292: R1137–R1145.



Warskulat U, Heller-Stilb B, Oermann E, Zilles K, Haas H, Lang F, Häussinger D. Phenotype of the taurine transporter knockout mouse. *Methods Enzymol.* 2007;428:439-58.

Welberg LA, Seckl JR. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Neuroendocrinol.* 2001 Feb;13(2):113-28.

Whitehead MC. Anatomy of the gustatory system in the hamster: synaptology of facial afferent terminals in the solitary nucleus. *J Comp Neurol.* 1986;244:72-85.

Williams S, George IM, Silva PA. Intrauterine growth retardation and blood pressure at age seven and eighteen. *J Clin Epidemiol.* 1992; 45:1257-63.

Winiarska K, Szymanski K, Gorniak P, Dudziak M, Bryla J. Hypoglycaemic, antioxidative and nephroprotective effects of taurine in alloxan diabetic rabbits. *Biochimie* 2009; 91 (2): 261-270.

Wise BL, Ganong WF. Effect of brainstem stimulation on renal function. *Am J Physiol.* 1960;198:1291-95.

Woodall SM, Johnston BM, Breier BH, Gluckman PD. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr Res.* 1996;40:438-43.

Wyss JM, Roysommuti S, King K, Kadisha I, Regan CP, Berecek KH. Salt-induced hypertension in normotensive spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1994; 23:791-6.

Wu J-Y, Prentice H. Role of taurine in the central nervous system. *Journal of biomedical science* 2010 Jan;17 Suppl 1(Suppl 1):S1.

Xu YJ, Arneja AS, Tappia PS, Dhalla NS. The potential health benefits of taurine in cardiovascular disease. *Exp Clin Cardiol.* 2008; 13(2):57-65.

Yamori Y, Taguchi T, Hamada A, Kunimasa K, Mori H, Mori M. Taurine in health and diseases: consistent evidence from experimental and epidemiological studies. *Journal of biomedical science* 2010 Jan;17 Suppl 1(Suppl 1):S6.

Yu L, Zheng M, Wang W, Rozanski GJ, Zucker IH, Gao L. Developmental changes in AT1 and AT2 receptor-protein expression in rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2010 Dec;11(4):214-21. Epub 2010 Aug 31.

Zanutto BS, Valentinuzzi ME, Segura ET. Neural set point for the control of arterial pressure: role of the nucleus tractus solitarius. *Biomedical engineering online* 2010 Jan;9:4.

Zapparoli A, Figueiredo JF, Boer PA, Rocha Gontijo JA. Impaired dipsogenic and renal response to repetitive intracerebroventricular angiotensin II (AngII) injections in rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2011; 12(3):161-8.

Zhang LL, Ashwell KWS. The development of cranial nerve and visceral afferents to the nucleus of the solitary tract in the rat. *Anat Embryol* 2001;204: 135-51.

Zhu DN, Moriguchi A, Mikami H, Higaki J, Ogihara T. Central amino acids mediate cardiovascular response to angiotensin II in the rat. *Brain Res Bull.*1998; 45:189-197.

## 8. ANEXOS

### Anexo I

Composição da dieta normoproteica 17% (NP).

<b>Dieta 17% de Proteínas (NP)</b>					
	<b>INGREDIENTES</b>	<b>1kg</b>	<b>5kg</b>	<b>10kg</b>	<b>15kg</b>
1	Amido de milho	397	1985	3970	5955
2	Caseína (84%)	202	1010	2020	3030
3	Dextrina (90-94%)	130,5	652,5	1305	1957,5
4	Sacarose	100	500	1000	1500
5	Óleo de soja	70	350	700	1050
6	Fibra	50	250	500	750
7	Mistura de sais (AIN 93%)	35	175	350	525
8	Mistura de vitaminas (AIN 93)	10	50	100	150
9	L-cistina	3	15	30	45
10	Bitartarato de colina	2,5	12,5	25	37,5

Tabela 2 - Ingredientes da ração com 17% de proteínas (NP)

## Anexo II

### Composição da dieta hipoproteica 6% (LP)

<b>Dieta 6% de Proteína (LP)</b>					
	<b>INGREDIENTES</b>	<b>1kg</b>	<b>5kg</b>	<b>10kg</b>	<b>15kg</b>
1	Amido de milho	480	2400	4800	7200
2	Caseína (84%)	71,5	357,5	715	1072,5
3	Dextrina (90-94%)	159	795	1590	2385
4	Sacarose	121	605	1210	1815
5	Óleo de soja	70	350	700	1050
6	Fibra	50	250	500	750
7	Mistura de sais (AIN 93%)	35	175	350	525
8	Mistura de vitaminas (AIN 93)	10	50	100	150
9	L-cistina	1	5	10	15
10	Bitartarato de colina	2,5	12,5	25	37,5

Tabela 3 - Ingredientes da ração com 6% de proteínas (LP)

### Anexo III

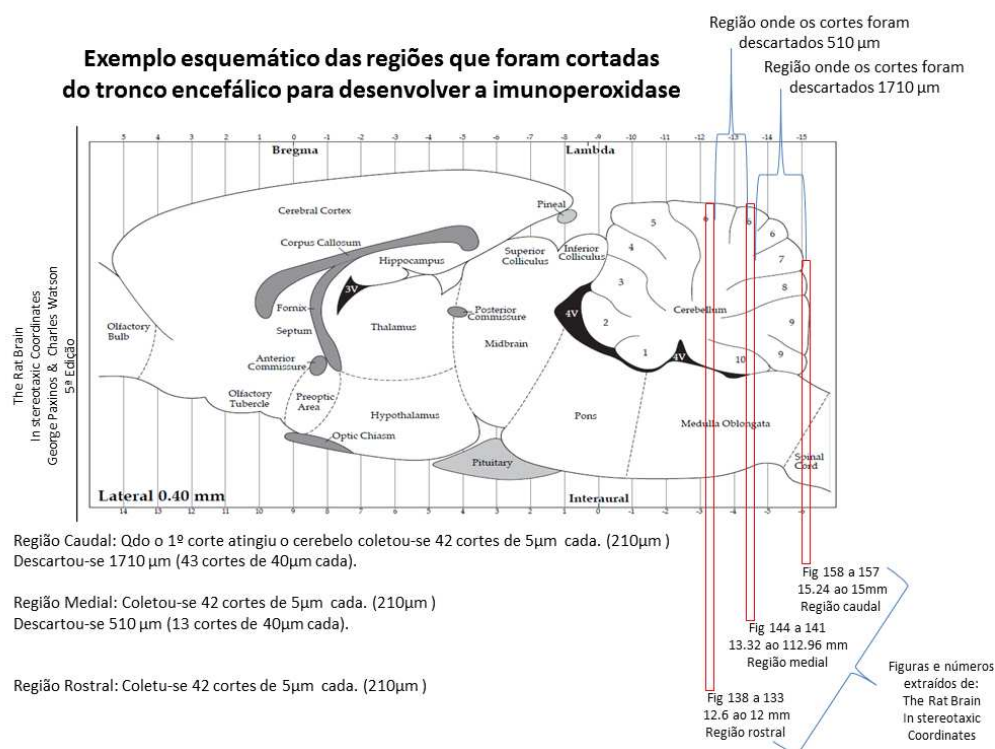
Composição da dieta hipoprotéica suplementada com 2,5% de taurina (LPT)

<b>Dieta 6% de Proteína + 2,5% de Taurina (LPT)</b>					
	<b>INGREDIENTES</b>	<b>1kg</b>	<b>5kg</b>	<b>10kg</b>	<b>15kg</b>
1	Amido de milho	480	2400	4800	7200
2	Caseína (84%)	71,5	357,5	715	1072,5
3	Dextrina (90-94%)	159	795	1590	2385
4	Sacarose	121	605	1210	1815
5	Óleo de soja	70	350	700	1050
6	Fibra	50	250	500	750
7	Mistura de sais (AIN 93%)	35	175	350	525
8	Mistura de vitaminas (AIN 93)	10	50	100	150
9	L-cistina	1	5	10	15
10	Bitartarato de colina	2,5	12,5	25	37,5
11	Taurina	25	125	250	375

Tabela 4 - Ingredientes da ração 6% suplementada com 2,5% de taurina (LPT).

## Anexo IV

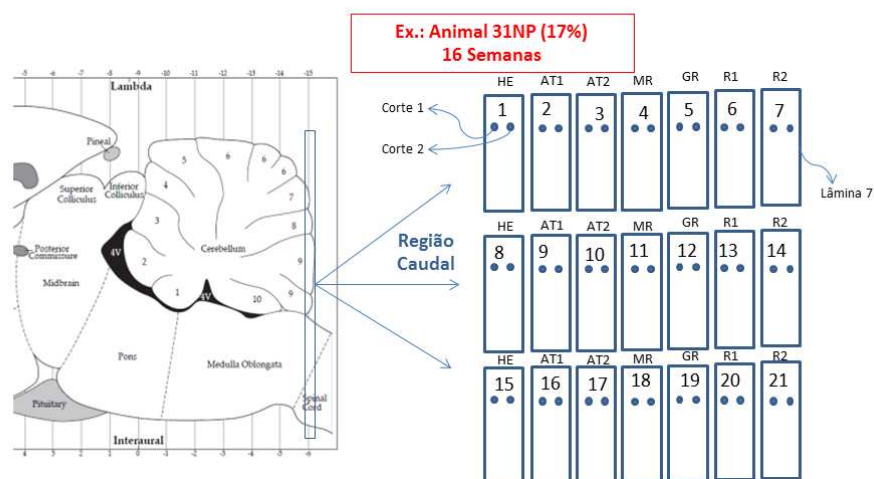
Esquema utilizado para a realização dos cortes histológicos do tronco encefálico para a realização da imunoperoxidase para localizar o núcleo do trato solitário (NTS).



## Anexo V

Esquema utilizado para a realização dos cortes histológicos do tronco encefálico para a realização da imunoperoxidase para localizar a parte caudal do núcleo do trato solitário.

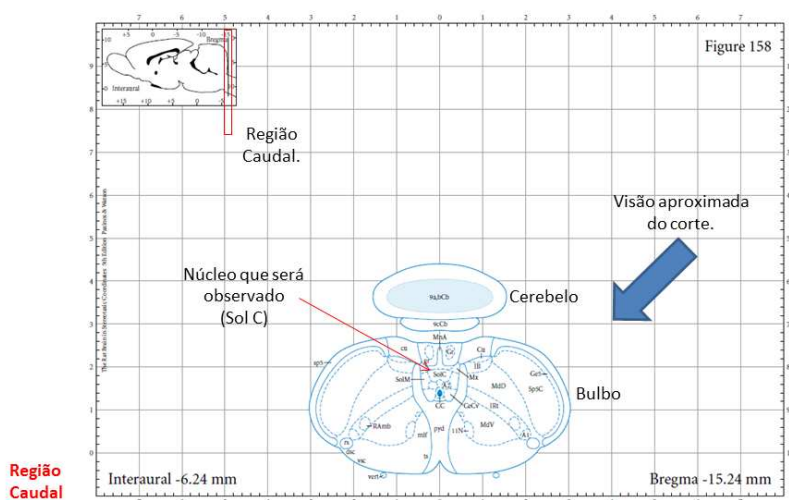
**Exemplo esquemático das regiões que serão cortadas , número de cortes e número de lâminas.**



3 jogos com 7 lâminas (H/E, AT1, AT2, Mr, Gr, R1 e R2).

R1 = lâmina de reserva 1.

R2 = lâmina de reserva 2.



**Passo 1:** Qdo o 1º corte pegar o cerebelo começar a coletar os 42 cortes seguintes. (2 por lâmina com 5µm cada). Vide esquema.

**Passo 2:** Regular o micrótomo para cortar com 40µm de espessura.

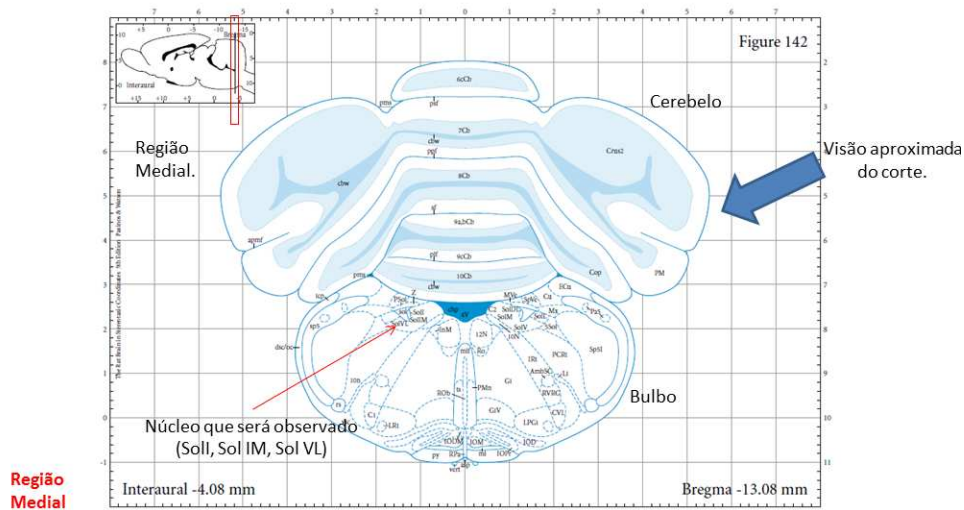
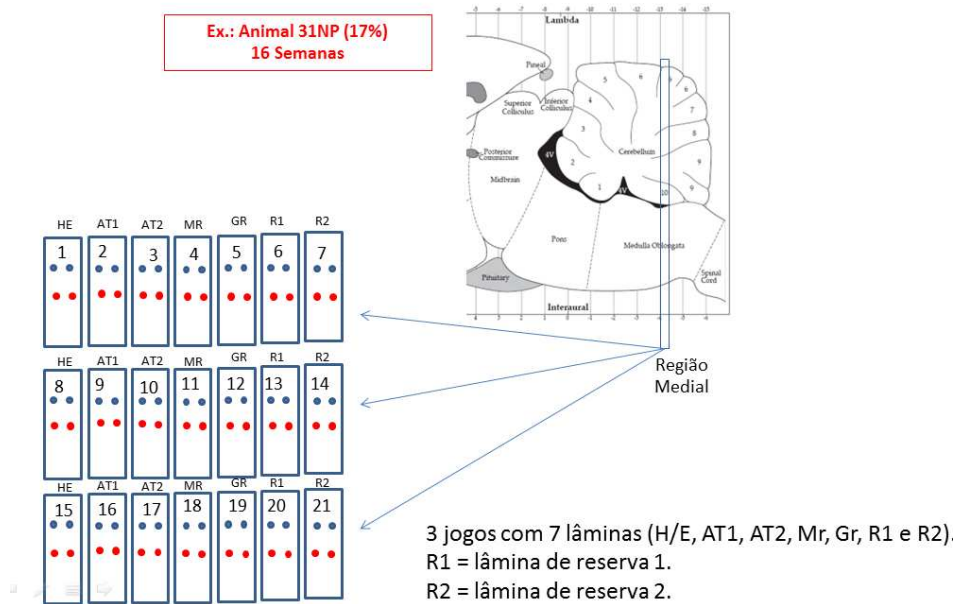
**Passo 3:** Descartar 43 cortes de 40µm cada.

**Passo 4:** Regular o micrótomo para cortar com 5µm de espessura novamente (veja fig. Região Medial)

## Anexo VI

Esquema utilizado para a realização dos cortes histológicos do tronco encefálico para a realização da imunoperoxidase para localizar a parte medial do núcleo do trato solitário.

**Exemplo esquemático das regiões que serão cortadas , número de cortes e número de lâminas.**



**Passo 1:** Comesse a coletar os cortes da região Medial ou seja, os 42 cortes seguintes. (2 por lâmina com 5 $\mu$ m cada). Vide esquema.

**Passo 2:** Regular o micrótomo para cortar com 40 $\mu$ m de espessura.

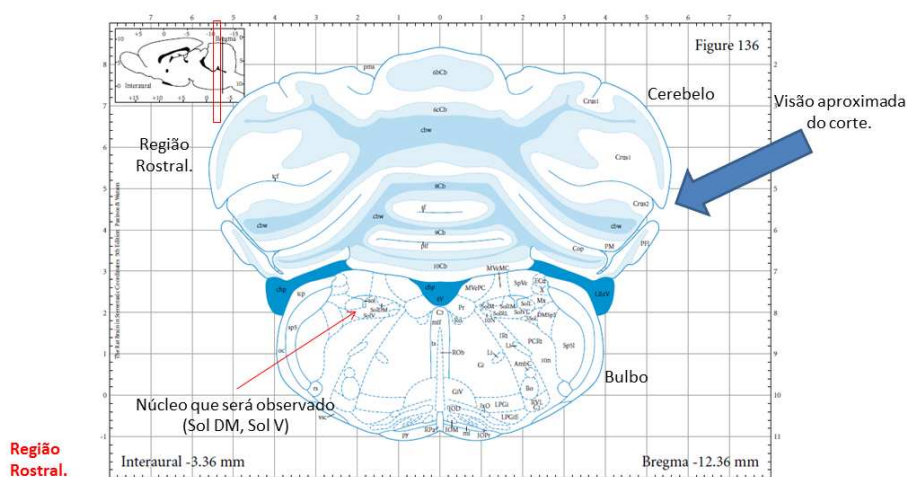
**Passo 3:** Descartar 13 cortes de 40 $\mu$ m cada.

**Passo 4:** Regular o micrótomo para cortar com 5 $\mu$ m de espessura novamente (veja fig. Região Rostral)



## Anexo VII

Esquema utilizado para a realização dos cortes histológicos do tronco encefálico para a realização da imunoperoxidase para localizar a parte rostral do núcleo do trato solitário.



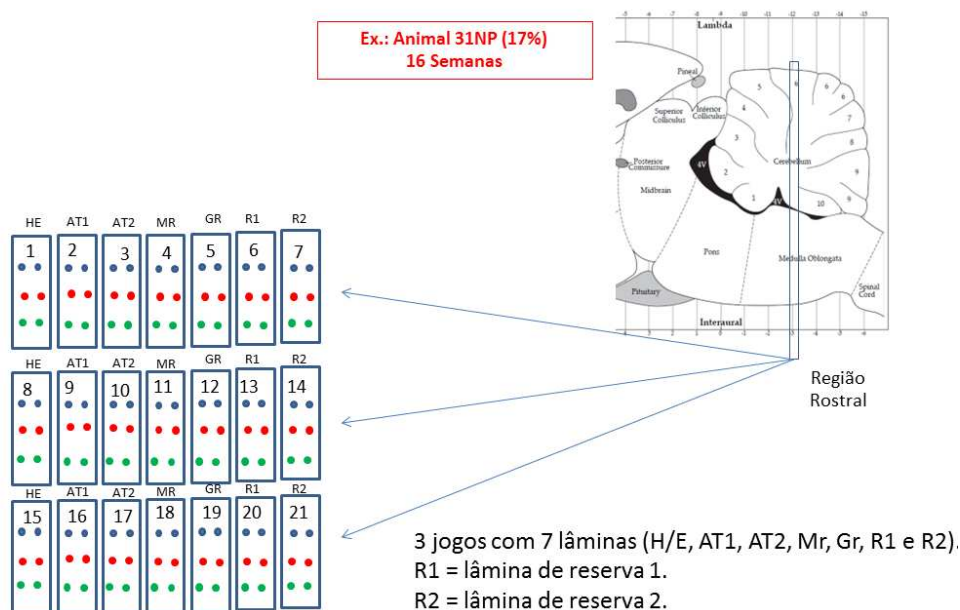
**Passo 1:** Comesse a coletar os cortes da região 3, ou seja, os 42 cortes seguintes. (2 por lâmina com 5µm cada). Vide esquema.

**Passo 2:** Regular o micrótomo para cortar com 40µm de espessura.

**Passo 3:** Descartar 43 cortes de 40µm cada.

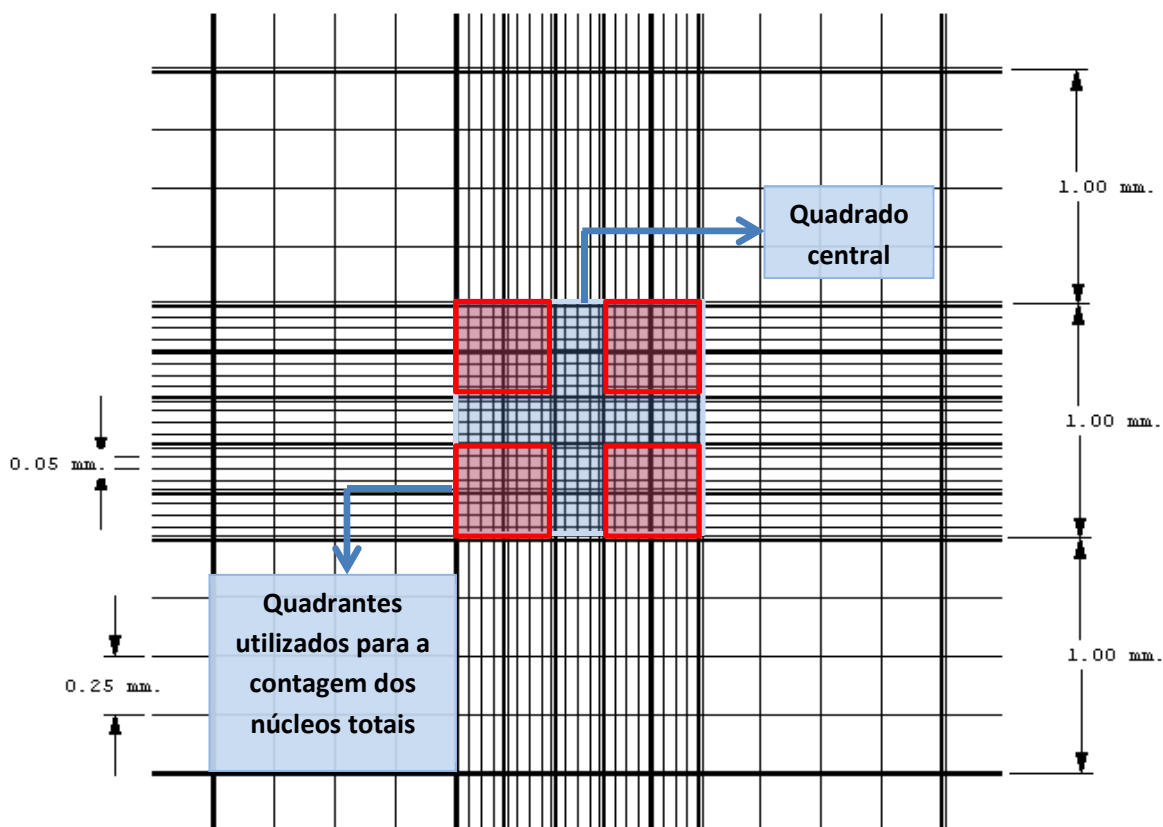
**Passo 4:** Regular o micrótomo para cortar com 5µm de espessura novamente.

### Exemplo esquemático das regiões que serão cortadas , número de cortes e número de lâminas.



## Anexo VIII

Esquema do interior da câmara de Neubauer que foi utilizada para a realização do fracionamento isotrópico.



Interior da câmara de Neubauer